

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**İN VİTRO FERTİLİZASYON HASTALARINDAN ELDE EDİLEN
GRANULOZA HÜCRELERİNDEKİ İNTRASELLÜLER
KALSİYUM DÜZEYİNİN VE OKSİDAN PARAMETRELERİN
OOSİT KALİTESİNE VE FERTİLİZASYON ORANLARINA
ETKİSİ**

Dr. Esra Nur TOLA

UZMANLIK TEZİ

KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. M. Tamer MÜNGAN

Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Projeleri Yönetim Birimi tarafından 1960-TU-09 proje numarası ile desteklenmiştir.

ISPARTA - 2011

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince ve tez çalışmamda desteklerini esirgemeyen tez danışmanım Prof. Dr. Tamer Mungan başta olmak üzere değerli hocalarım Prof. Dr. Gökhan Bayhan, Prof. Dr. Baha Oral, Doç. Dr. Okan Özkaya, Doç. Dr. Mekin Sezik, Doç. Dr. Mehmet Güney, Doç. Dr. Evrim Erdemoğlu, Yrd. Doç. Dr. İlker Günyeli'ye;

Uzmanlık tezimin hazırlanmasında büyük katkıları olan Prof. Dr. Mustafa Nazıroğlu'na ve Yrd. Doç. Dr. Cihangir Uğuz'a;

Uzmanlık eğitimim boyunca birlikte çalıştığım asistan arkadaşlarıma; eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini eksik etmeyen anneme, babama ve abime;

Teşekkür ederim.....

Dr. Esra Nur TOLA

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR	vi
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
RESİMLER DİZİNİ	x
GRAFİKLER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. İnfertilite	3
2.1.1. İnfertilite Tanımı.....	3
2.1.2. İnfertilite Nedenleri	3
2.1.3. İnfertil Çiftin Değerlendirilmesi	3
2.1.4. İnfertilitenin Spesifik Nedenlerinin Değerlendirilmesi	4
2.1.4.1. Ovulatuvar Bozukluklar	4
2.1.4.2. Tubaperitoneal Bozukluk	7
2.1.4.3. Uterin Anomali.....	7
2.1.4.4. Servikal Bozukluk	7
2.1.4.5. Semen Analizi	8
2.1.5. İnfertilite Tedavisinde İn Vitro Fertilizasyon Yöntemleri.....	8
2.1.5.1. İVF ve ICSI Yöntemi	8
2.1.5.2. Kontrollü Overyan Hiperstimulasyon Protokolleri.....	10
2.1.5.3. Ovulasyonun Tetiklenmesi.....	12
2.1.5.4. Luteal Faz Desteği.....	13
2.1.5.5. Tedavide Monitorizasyon.....	13
2.2. Folikülogenezis ve Oosit Maturasyonu	14
2.2.1. Overin Yapısı ve Folikülogenezis	14
2.2.2. Oositin Büyüme-Gelişme ve Olgunlaşması.....	16
2.2.3. Oosit Kalitesine Etkili Faktörler	18
2.2.4. Oosit ile Granuloza Hücrelerinin İlişkisi	20
2.3. Hücre İçi Kalsiyum Sinyali	21
2.3.1. Hücre İçi Kalsiyum Sinyali ve Önemi	21

2.3.2. Hücre İçi Kalsiyum Sinyalinin Oluşumu.....	22
2.3.3. Oosit Maturasyonunda Kalsiyumun Rolü	24
2.3.4. Fertilizasyonda Kalsiyumun Rolü	24
2.4. Oksidatif Stres	25
2.4.1. Serbest Radikaller	25
2.4.1.1. Süperoksit Radikali (O_2^-).....	27
2.4.1.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	27
2.4.1.3. Hidroksil Radikali (OH^-).....	28
2.4.2. Serbest Radikallerin Etkileri	28
2.4.2.1. Oksidatif Stresin Proteinlere Etkisi.....	29
2.4.2.2. Oksidatif Stresin Membran Lipidlerine Etkisi	29
2.4.2.3. Oksidatif Stresin Nükleik Asitlere Etkisi.....	30
2.4.2.4. Oksidatif Stresin Karbonhidratlara Etkisi	30
2.4.3. Antioksidan Savunma Sistemleri.....	30
2.4.3.1. Süperoksit Dismutaz (SOD).....	31
2.4.3.2. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)	32
2.4.3.3. Glutasyon (GSH)	33
2.4.4. Granuloza Hücreleri ve Oksidatif Stres	33
3. MATERYAL METOD	35
3.1. Materyal.....	35
3.1.1. Kullanılan Malzemeler ve Aletler	35
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	36
3.2. Metod.....	36
3.2.1. Hastaların Seçimi.....	37
3.2.2. Oositlerin Gelişimi.....	38
3.2.3. Tedavinin Monitorizasyonu ve Oosit Pick-up İşlemi.....	39
3.2.4. Oositlerin Gradelemesi	40
3.2.5. Granuloza Hücrelerinin Elde Edilmesi	40
3.2.6. Granuloza Hücrelerindeki İntrasellüler Kalsiyum Sinyalinin Değerlendirilmesi	40
3.2.7. Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Ölçümü.....	41
3.2.7.1. Lipit Peroksidasyon Analizi.....	41
3.2.7.2. İndirgenmiş Glutasyon (GSH) ve Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Analizleri.....	42

3.2.8. ICSI İşlemi ve Embriyo Transferi	43
3.2.9. İstatiksel Analiz	44
4. BULGULAR	45
5. TARTIŞMA	57
ÖZET.....	66
SUMMARY	67
KAYNAKLAR	68

SİMGELER ve KISALTMALAR

PID	: Pelvik inflamatuvar hastalık
PCOS	: Polikistik over sendromu
BMI	: Vücut kitle indeksi
LH	: Luteinizan hormon
TV-USG	: Transvaginal ultrason
HSG	: Histerosalpingografi
PG	: Progesteron
FSH	: Folikül stimulan hormon
E2	: Estradiol
CL	: Korpus luteum
AMH	: Anti müllerian hormon
CC	: Klomifen sitrat
GnRH	: Gonadotropin releasing hormon
GnRH_a	: Gonadotropin releasing hormon agonisti
EFORT	: Eksojen FSH overyan rezerv testi
AFS	: Antral folikül sayısı
İVF	: İn vitro fertilizasyon
GIFT	: Gamet intra fallopian transfer
ZIFT	: Zigot intra fallopian transfer
ICSI	: İntra stoplazmik sperm injeksiyonu
ET	: Embriyo transferi
cADPR	: Siklik adenzin difosfat ribozil siklaz
PVP	: Polivinil pirolidon
CO₂	: Karbon dioksit
KOH	: Kontrollü overyan hiperstimulasyon
OPU	: Oosit pick up
hCG	: Human koryonik gonadotropin
OHSS	: Overyan hiperstimulasyon sendromu
r-hCG	: Rekombinan hCG
im	: İntramuskuler
sc	: Subcutan

ZP	: Zona pellusida
GV	: Germinal vezikül
ER	: Endoplazmik retikulum
GER	: Granüllü endoplazmik retikulum
OMİ	: Oosit maturasyon inhibitörü
MPF	: Maturasyon başlatan faktör
MI	: Metafaz 1
MII	: Metafaz 2
Ach	: Asetilkolin
ADP	: Adenozin difosfat
Ca⁺²	: Kalsiyum İyonu
[Ca⁺²]	: Kalsiyum konsantrasyonu
GSH	: Glutatyon
GSH-R	: Glutatyon redüktaz
GSSG	: Okside glutatyon
GSH-Px	: Glutatyon peroksidaz
GTPaz	: Guanozin trifosfataz
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
RyR	: Ryanodin reseptörü
IP₃	: İnositol 1,4,5 trifosfat
PIP₂	: Fosfotidil inositol 4,5 difosfat
DAG	: Diaçilgliserol
GTP	: Guanozin trifosfat
GDP	: Guanozin difosfat
SOD	: Süperoksit dismutaz
CuZn-SOD	: Bakır çinko iyonu içeren süperoksit dismutaz
Mn-SOD	: Manganez iyonu içeren süperoksit dismutaz
EC-SOD	: Ekstraselüler süperoksit dismutaz
aa	: Aminoasit
NADH	: Redükte nikotinamid adenin dinükleotid
NAD⁺	: Okside nikotinamid adenin dinükleotid
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
O₂	: Moleküler oksijen

O₂⁻	: Süperoksit radikali
OH⁻	: Hidroksil radikali
PKA	: Protein kinaz A
PKC	: Protein kinaz C
PLC	: Fosfolipaz C
MDA	: Malondialdehit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
H	: Hidrojen
Cu	: Bakır
Zn	: Çinko
Mn	: Manganez
Fe⁺²	: Demir iyonu
Se	: Selenyum
ROOH	: Hidroperoksit
-SH	: Sülfhidril
ROT	: Reaktif oksijen türleri
OS	: Oksidatif stres
8-OHdG	: 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin
CICR	: Kalsiyum etkili kalsiyum salınımı
TPRM2	: Transient receptör potential katyon kanalları
YÜT	: Yardımcı üreme teknikleri
AST	: Aspartat amino transferaz
ALT	: Alanin amino transferaz
EKG	: Elektrokardiyografi
TBARS	: Tyobarbitürik asit
TCA	: Trikloroasetik asit
HCL	: Hidroklorik asit
CHPO	: Kumen hidroperoksit
TRP	: Transient reseptör potential
SET	: Single embriyo transferi

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1. İnfertilite etyolojisi dağılımı.	3
Tablo 2. Semen analizi.	8
Tablo 3. Oosit gradelemesi.	40
Tablo 4. GSH-Px deneyinin analiz şeması ve kullanılan kimyasallar.	43
Tablo 5. Verilen ilaç protokolü ile GSH-Px aktivitesi, GSH, MDA, Ca ⁺² düzeyleri arasındaki ilişki.	45
Tablo 6. Fertilizasyon ile Ca ⁺² ve antioksidanlar arasındaki ilişki.	47
Tablo 7. Grade ile fertilizasyon ilişkisi.	50
Tablo 8. Grade B ve grade C oositlerde fertilizasyon oranının karşılaştırması.	51
Tablo 9. Grade A ve grade C oositlerde fertilizasyon oranının karşılaştırması.	52
Tablo 10. Grade A ve grade B oositlerde fertilizasyon oranının karşılaştırması.	52
Tablo 11. Oosit gradelerine göre GSH-Px aktivitesi, GSH, MDA ve Ca ⁺² değerleri ortalamalarının ilişkisi.	53
Tablo 12. Uygulanan ilaç protokolü ile fertilizasyon sonuçları arasındaki ilişki.	55
Tablo 13. Yapılan gradelemenin doğruluk derecesi.	56

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. OPU sırasında overin görünümü.	39
---	----

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Deniz kestanesi yumurta hücrelerinde fertilizasyon esnasında artan kalsiyum miktarı.....	62
--	----

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 1. Agonist ve antagonist ilaç verilen hastaların GSH-Px aktivitesi değerleri ortalamaları	45
Grafik 2. Agonist ve antagonist ilaç verilen hastaların GSH değerleri ortalamaları	46
Grafik 3. Agonist ve antagonist ilaç verilen hastaların MDA değerleri ortalamaları.	46
Grafik 4. Agonist ve antagonist ilaç verilen hastaların Ca^{+2} konsantrasyonları ortalamaları.	47
Grafik 5. GSH-Px aktivitesi değerleri ortalaması ile fertilizasyon arasındaki ilişki.	48
Grafik 6. GSH değerleri ortalaması ile fertilizasyon arasındaki ilişki.....	49
Grafik 7. MDA değerleri ortalaması ile fertilizasyon arasındaki ilişki.....	49
Grafik 8. Ca^{+2} konsantrasyon ortalaması ile fertilizasyon arasındaki ilişki.....	50
Grafik 9. Oosit grade ile fertilizasyon arasındaki ilişki.	51
Grafik 10. GSH-Px ortalamaları ile oosit gradeleri arasındaki ilişki.....	54
Grafik 11. GSH düzeyleri ile oosit gradeleri arasındaki ilişki.....	54
Grafik 12. MDA ortalamaları ile oosit gradeleri arasındaki ilişki.	54
Grafik 13. Ca^{+2} düzeyi ile oosit gradeleri arasındaki ilişki.....	55
Grafik 14. Uygulanan ilaç protokolu ile fertilizasyon arasındaki ilişki.....	56

1. GİRİŞ

İnfertilite korunmasız cinsel ilişkiye rağmen bir yıl boyunca gebe kalınmamasıdır. Reprodüktif dönemdeki kadınların %10-15'ini etkileyen bir problemdir. İnfertilitenin yaklaşık 1/3 nedeni erkek kaynaklı, 1/3 nedeni kadın kaynaklı, 1/3 nedeni ise her iki çift kaynaklıdır. Kadın faktörünün önemli bir kısmını ovulatuvar ve tubaperitoneal faktörler oluşturur.

Oositler overde foliküller içinde bulunurlar. Reprodüktif dönemin başında insan overinde yaklaşık 400 bin tane primordial folikül bulunur. Primordial folikül, mayozun profaz 1 evresinde olan primer oosit ve bunun etrafında bazal membran ile tek sıra granuloza hücresi içerir. Reprodüktif dönemle beraber her siklusta belli miktarda folikül gelişmeye başlar. Folikülogenezis denen bu olay sonucunda primordial foliküller sırasıyla primer folikül, sekonder folikül ve graff folikülü aşmasına gelerek ovule olurlar. Ovulasyondan 1-2 saat önce kalsiyumun (Ca^{+2}) tetiklediği bir mekanizma ile primer oosit 1. mayoz bölünmesini tamamlayarak sekonder oositi oluşturur. Granuloza hücreleri oositin metabolizma ve büyümesinin devamlılığını sağlar, oositin gelişim ve olgunlaşması için faydalıdır. Ayrıca mayoz bölünmeyi kontrol ederler. Foliküler granuloza hücrelerinin canlılığı oosit gelişimi için önemlidir. Folikülogenezis sırasında oluşan reaktif oksijen türleri (ROT), granuloza hücreleri tarafından antioksidan mekanizmalar ile ortadan kaldırılarak oosit oksidatif stresin indüklediği apoptozisten korunur.

Canlılarda gerçekleşen pek çok önemli olayda Ca^{+2} iyonu belirleyici rol oynamaktadır. Bu olaylar arasında hücre bölünmesi, apoptozis, oosit maturasyonu, oositin döllenme sonucu aktivasyonu sayılabilir. Bu özelliği ile pek çok fonksiyonu kontrol etmesi, hücre içindeki kalsiyumun düzenli olarak ayarlanmasına bağlı olmaktadır. Hücre içi Ca^{+2} sinyali, hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunun geçici bir şekilde artışından oluşur. Ca^{+2} , bu sinyal oluşturma özelliğinden dolayı, hücre için bir ikincil habercidir.

Hücrelerde endojen ve ekzojen kaynaklı etmenlere bağlı olarak oluşan serbest radikaller lipidlere, karbonhidratlara, nükleik asitlere ve proteinlere zarar verip hücreleri apoptozise uğratırlar. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir (1). Başlıca serbest oksijen radikalleri süperoksit

radikali (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikalidir (OH^-). Vücutta ekzojen ya da endojen yol ile oluşan reaktif oksijen radikallerini ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için antioksidan savunma sistemleri vardır. Serbest radikallerin oluşum hızında artma veya ortadan kaldırılma hızında azalma olmasına oksidatif stres (OS) denir. OS, üreme ve gelişme patolojisi ile ilişkilidir. Granuloza hücrelerindeki antioksidan enzimler, oosit maturasyonunu düzenler ve yardımcı üreme tekniklerindeki başarı oranları ile ilişkilidir. Granuloza hücrelerindeki geliştirilmiş ROT üretimi (2) düşük oosit fertilizasyon kabiliyeti, düşük embriyo kalitesi ve azalmış implantasyon oranları ile ilişkili bulunmuştur. Fertilizasyonun düzenlenmesinde ROT ve antioksidanların önemi dikkate alınmalıdır.

Fertilizasyon başarısında oositin ve etrafındaki kumulus-korona kompleksinin önemli bir rolü vardır. Oosit kalitesi belirlenirken mayoz bölünmenin aşaması, oosit stoplazma özellikleri, ooplazmik vakuoller, refraktil cisimler, oosit şekli ve çapı, polar cisim özellikleri, zona pellusida özellikleri, perivitellin aralık değerlendirilir. Foliküler sıvı ve granuloza hücreleri oositle yakın ilişkide olduklarından bunların incelenmesi ile elde edilen sonuçlar da fertilizasyon başarısını tespit etmede kullanılabilir.

Bu çalışmada in vitro fertilizasyon hastalarından oosit pick-up (OPU) işlemi ile alınan oositlerin etrafındaki granuloza hücrelerindeki glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitesi, glutatyon (GSH), malondialdehit (MDA) ve Ca^{+2} düzeylerine bakarak,

1. Granuloza hücrelerindeki GSH-Px aktivitesi, GSH, MDA ve Ca^{+2} düzeylerinin fertilizasyon ve oosit kalitesinin tahmini için prediktör olarak kullanılabilirliğini ölçmeyi hedefledik.

2. Oosit kalitesi ile fertilizasyon arasında ilişki olup olmadığını bulmayı planladık.

3. İn vitro fertilizasyon yöntemlerinde verilen farklı ilaç protokollerinin fertilizasyon ve granuloza hücrelerindeki Ca^{+2} ve oksidan parametreler üzerindeki etkilerini bulmayı hedefledik.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İnfertilite

2.1.1. İnfertilite Tanımı

İnfertilite korunmasız cinsel ilişkiye rağmen bir yıl boyunca gebe kalmamamasıdır. Reprodüktif dönemdeki kadınların %10-15'ini etkileyen bir problemdir. Eğer canlı ya da cansız hiç gebelik elde edilememiş ise primer infertilite, sonucu her ne olursa olsun gebelik bir kere de olsa oluşmuşsa sekonder infertilite denir. Fekondabilite bir kadının tek bir menstrual siklusta gebe kalabilme olasılığıdır. Büyük data bazlı çalışmalar göstermiştir ki bir kadının fekondabilite oranı %25'tir.

2.1.2. İnfertilite Nedenleri

Kabaca infertilitenin 1/3 nedeni kadın kaynaklı, 1/3 nedeni erkek kaynaklı, 1/3 nedeni ise her iki çift kaynaklıdır.

Tablo 1. İnfertilite etyolojisi dağılımı.

İnfertilite Etiyolojisi	Oran (%)
Erkek Faktörü	25
Ovulatuvar Faktör	27
Tubal/Uterin Faktör	22
Diğerleri	9
Açıklanamayan	17

2.1.3. İnfertil Çiftin Değerlendirilmesi

Hastalardan ayrıntılı anamnez alınmalı (Jinekolojik öykü, medikal öykü, cerrahi öykü, kullandığı ilaçlar, sosyal öykü, etnisite), fizik muayene yapılmalıdır.

Jinekolojik öyküde menstruasyon düzeni, önceki kontraseptif kullanımı, infertilite süresi, koitus sıklığı hakkında detaylı anamnez alınmalıdır. Medikal öyküde hiperprolaktinemi, hipertirodi, hipotirodi, hiperandrojenemi varlığı

(hirsutizm, akantozis nigrikans, alopesi), polikistik over sendromu (PCOS), konjenital adrenal hiperplazi olup olmadığı sorgulanmalıdır. Pelvik ve abdominal operasyonlar, rüptüre apandisit pelvik adezyonlara neden olabileceği için bu konuda hastadan bilgi alınmalıdır. Hastanın yaşam şekli, çevresel faktörler, sigara-alkol-kafein-marijuana kullanımı sorgulanmalıdır. Vücut kitle indeksine (BMI) bakılmalıdır. Ailede infertilite öyküsü, tekrarlayan abort, fetal anomali olması genetik bir temel olabileceğini düşündürür.

Fizik muayenede kilo, boy, tansiyon arterial, hirsutizm, alopesi, akne, akantozis nigrikans varlığı bakılmalıdır. Tiroid ve meme muayenesi mutlaka yapılmalıdır.

Jinekolojik muayenede vagenin nemliliği, serviksin durumu, uterusun şekli ve mobilitesi değerlendirilmelidir. Tüm hastalardan mutlaka servikal smear, neisseria gonore ve klamidya için kültür alınmalıdır.

2.1.4. İnfertilitenin Spesifik Nedenlerinin Değerlendirilmesi

2.1.4.1. Ovulatuvar Bozukluklar

Ovulatuvar bozuklukların tanısında değişik metodlar kullanılabilir. Metodların birbirlerine üstünlükleri fazla değildir. Bazı metodlar daha basit, noninvazif ve ucuz, bazı metodlar ise daha karmaşık ve pahalı yöntemlerdir.

Bazal Vücut Isısı

Amaç her sabah vücut ısısı ölçülerek progesteronun (PG) termojenik etkisinden yararlanmaktır. Postovulatuvar PG etkisi ile bazal vücut ısısı 0.4°-0.8°F artar. Bu bifazik patern ovulasyon için prediktiftir (3) Progesteron >5 ng/ml olduğunda veya ovulasyondan yaklaşık 4 gün sonra ısı artışı belirgindir (4). Bazal vücut ısısına bakarak ovulasyon tayini yapmak ucuz bir yöntemdir ama pek çok kadında sensitivitesi azdır.

Menstrual Öykü

25-35 gün arası siklus süresi olan, menstruasyon periyodu 3-10 gün arası süren, mittelschmerz izlenen, premenstrual semptomların olduğu, dismenorenin izlendiği sikluslar ovulatuvar sikluslardır.

Ovulasyon Prediktör Kitleri

Sabah ilk idrarda kolorimetrik yöntemle luteinizan hormon (LH) ölçümüne dayanır. Ölçüme tahmin edilen LH pikinden yaklaşık 2-3 gün önce başlanmalıdır ve günlük devam edilmelidir. LH pikinden 48 saat içinde ovulasyon gerçekleşir (5).

Serum Progesteron Düzeyi

Midluteal faz serum PG düzeyi 28 günlük bir siklusta 21. gün bakılır. PG >10 ng/ml olması ovulasyonu destekler (5, 6).

Endometrial Biyopsi

Ovulasyon gerçekleşmesi sonucu korpus luteumdan (CL) salınan PG etkisi ile endometriumda sekretuar özellikler meydana gelir. Bu nedenle siklusun luteal fazında alınan endometrial örnekte sekretuar endometriumun olması ovulasyon olduğunu gösterir. İnvaziv bir işlemdir, bu yüzden kronik anovulasyonlu kadınlarda hiperplazinin ekarte edilmesi amacı ile veya kronik endometrit şüphesi varsa kullanılması önerilen bir yöntemdir (7).

Overyan Rezerv Testleri

1.Yaş: Yardımcı üreme tekniklerinde (YÜT) elde edilen başarı, yaş arttıkça azalmaktadır. Yaşlı kadınlarda oosit, embriyo sayısı ve implantasyon şansı düşüktür (8). Chuang ve ark. yapmış olduğu bir araştırmada 1045 in vitro fertilizasyon (İVF) siklusunda 35 yaş altında, yaşın folikül stimulan hormon (FSH) değerinden daha anlamlı derecede İVF başarısını gösterdiğini saptamışlardır (9).

2. Bazal Estradiol: Evers ve ark. foliküler evrenin başlangıcında bakılan estradiol (E2) seviyesi 60 pg/ml üzerinde olanlarda yüksek siklus iptali ve toplanan oosit sayısında azalma saptamıştır. Fratelli ve ark. ise bazal E2 20 pg/ml altında ve 80 pg/ml üzerinde olan kadınlarda daha yüksek siklus iptali olduğunu saptamışlardır (10).

3. Bazal Serum FSH: Aschrafti ve ark. 212 İVF siklusunda erken foliküler evrede bakılan FSH düzeyleri 15 IU/ml üzerinde olan kadınlarda, daha az oosit toplandığını ve siklus iptalinin daha fazla olduğunu saptamıştır (11).

4. İnhibin B: Overde granuloza ve teka hücrelerinden salgılanan, primer olarak görevi FSH salgılanmasını inhibe etmek olan hormondur. Seifer ve ark. serum inhibin B seviyelerinin 45 pg/ml olanlarda daha yüksek estrojen cevabı olduğunu ve daha fazla oosit toplandığını göstermişlerdir (12).

5. Klomifen Sitrata (CC) Stimülasyon Testi: Test menstrual siklusun 3. gününde FSH düzeyleri ölçülmesinin ardından, 5. ile 9. günleri arasında 100 mg CC kullanılmasını takiben 10. günde FSH düzeyinin tekrar ölçülmesiyle yapılmaktadır. CC'nin pituitar reseptörlerde estrojeni antagonize ederek FSH düzeylerini artırması sonrası oluşan foliküllerden salgılanan E2'nin FSH'yı baskılamasına dayanmaktadır (13). Bazal ve stimüle FSH düzeylerinin toplamının 26 IU/ml üzerinde olması olumsuz olarak yorumlanmıştır (14).

6. Gonadotropin Salgılatıcı Hormon Agonisti Stimülasyon Testi: Gonadotropin salgılatıcı hormon agonisti (GnRHa) uygulanması sonrasındaki ilk 24 saatte parlama (flare-up) etkisiyle E2 ve inhibin B seviyelerinde artış olmasını esas alan dinamik over rezerv testidir. Yüksek maliyetli olması ve gebelik planlanmadan analogların kullanılması nedeniyle kullanımı kısıtlanmıştır (15).

7. Eksojen FSH Overyan Rezerv Testi (EFORT): Menstrual siklusun 3. gününde 300 IU rekombinan FSH'nın subkütan (sc) olarak uygulanmasını takiben 24 saat sonra E2 ve inhibin B seviyesinin ölçülmesiyle hesaplanmaktadır.

8. Antral Folikül Sayısı (AFS): Transvaginal ultrason (TV-USG) ile overlerdeki 10 mm'den küçük foliküllerin menstrual siklusun başında sayılmasıyla uygulanan bir testtir. Chang ve ark tarafından YÜT sikluslarında yapılan bir çalışmada AFS'i <4, 4-10, >10 olarak gruplandırmış; bu 3 grupta sırasıyla siklus iptal oranları %68.8, %5.3, %0 olarak bulunmuştur.

9. Over Hacmi: Stimüle olmamış overlerin TV-USG ile hacminin hesaplanmasına dayanmaktadır. Over hacmi <3 cm³ olması olumsuz prognostik faktördür.

10. Over Kan Akımı: TV-USG yardımıyla over stroması ve perifoliküler over dokusunun kan akımının doppler ile ölçülmesiyle hesaplanmaktadır. Shrestha ve ark. 34 infertil kadında yaptıkları çalışmada yüksek perifoliküler kan akımı bulunanlarda gebe kalma oranlarını anlamlı olarak fazla tespit etmişlerdir (16). Kim

ve ark. kontrollü overyan hiperstimülasyon (KOH) yapılan 99 hastada overin stromal arterindeki kan akımlarının doppler incelemesinde düşük pulsatilite indeksinin yüksek gebelik oranını predikte ettiğini göstermişlerdir (17).

11. Over Biyopsisi. Birim hacimdeki over folikül sayısının histolojik olarak hesaplanması esaslı ile ölçülür. Primordial foliküllerin over dokusu içerisinde farklı yoğunluklarda olması ve invazif bir yöntem olması nedeniyle over biyopsisi önerilmemektedir.

12. Antimülleryan Hormon (AMH): Başlıca primordial ve preantral foliküllerden salgılanmaktadır (18). AMH, klinik olarak inaktif overyan primordial folikül havuzunu gösterdiği için over rezerv testleri içinde önemli bir yere sahiptir.

2.1.4.2. Tubaperitoneal Bozukluk

Pelvik inflamatuvar hastalık (PID), ektopik gebelik, endometriozis, tubal cerrahi pelvik adhezyon için risk faktörleri olarak sayılmaktadır. Bir kez akut PID geçirenlerde %10-12, iki epizod sonrası %23-25 ve üç epizod sonrası %54-75 oranında tubal infertilite oluşmaktadır. PID'in en sık nedeni neisseria gonore ve clamidya trachomatistir. Tanıda histerosalpingografi (HSG), sonohisterografi ve laparoskopi kullanılmaktadır.

2.1.4.3. Uterin Anomali

Konjenital uterin anomaliler, myom, intrauterin adezyon, endometrial polip ve kronik endometrit uterusu ait fertilitiyi olumsuz etkileyebilecek patolojilerdir. Uterin patolojilerin değerlendirilmesinde HSG, TV-USG, sonohisterografi ve histeroskopi, manyetik rezonans ve laparoskopi kullanılmaktadır.

2.1.4.4. Servikal Bozukluk

Estrojen, servikal mukus üretimini ve akışkanlığını artırırken, PG tam ters bir etki gösterir. Post coital testte (Sims Hühner Testi), servikal mukus ovulasyondan hemen önce veya ilişkiden sonra 2-12 saat içinde değerlendirilir. Mukusun fiziksel özellikleri, vizkositesi, fernig testi, motil sperm aranması esasına dayanır.

2.1.4.5. Semen Analizi

Üç günlük koitus yasağından sonra erkekte mastürbasyon yöntemi ile spermler alınır. Alınan ejakulatın volumüne, viskositesine, spermlerin sayısına ve morfolojisine bakılır.

Tablo 2. Semen analizi.

Volum	>1.5 ml
Sperm konsantrasyonu	>20 milyon/ml
Motilite	>50%
Morfoloji	>30% normal >14% (Kruger's)
Lökosit sayısı	<1 milyon/ml
Eritrosit sayısı	<5 milyon/ml

2.1.5. İnfertilite Tedavisinde İn Vitro Fertilizasyon Yöntemleri

Gebelik sonuçlarını artırmak için oosit, sperm ve embriyonun manipüle edilebileceği birçok teknik tanımlanmıştır. Bunlar gamet intra fallopian transfer (GIFT), zigot intra fallopian transfer (ZIFT), in vitro fertilizasyon (İVF) ve embriyo transferi (ET) ve intrastoplazmik sperm injeksiyonu (ICSI) prosedürlerini içermektedir. Bunlardan en çok kullanılanları ilk kez 1970 yılında gerçekleştirilen İVF-ET, ilk kez 1992'de bildirilen ve son yıllarda popülerite kazanan ICSI prosedürüdür.

2.1.5.1. İVF ve ICSI Yöntemi

İVF prosedürü için toplanan semen, swim up ya da gradient santrifuj yöntemleri ile işleme tabii tutulur. Ardından spermler proteinle desteklenmiş ortamda kapasitasyonu gerçekleştirilmesi için 4 saate kadar inkübe edilir. Ovum başına en az 100.000 kapasite olmuş sperm ovumla beraber inkübe edilir ve 18 saat kadar sonra oositler fertilizasyon açısından incelenir (19).

Düşük sperm sayısında, sperm motilitesi az ve morfolojisi bozuk olduğunda konvansiyonel İVF başarısız olur (20). Bu durumda bir ovumun fertilizasyonu için sadece fonksiyonel bir genomu ve sentrozomu olan bir spermatozoa yeterli olduğu ICSI işlemi kullanılır. Böylece kapasitasyon, hiperaktivasyon, zona pellusida (ZP) ve oolemanın tanınması ve geçilmesi safhaları atlanmış olur. ICSI ile immotil ve vital olmayan spermatozoa ile fertilizasyon oranları düşüktür. Bunun dışında konsantrasyon, morfoloji (globozoospermi dışında) ve yüksek antisperm antikor konsantrasyonları ICSI başarısını etkilemez. ICSI için öncelikle oositler ön inkübasyon için 37°C ve %5 karbondioksitli (CO₂) ortamda 1 ile 9 saat arasında bekletilir. ICSI işlemi uygulanacak petriyer hazırlanır. Bu petriyerin içinde, içine oosit konulan her biri 5 µl'lik HEPES tamponlu damlalar hazırlanır, damlaların yanına polivinilpirolidin (PVP) içeren diğer bir damla daha konur. PVP damlacığı spermler içindir. Damlaların üzeri CO₂ ile dengelenmiş mineral ve yağ ile örtülür. Hazırlanan petriyer kapları inkübatöre konular. Ön inkübasyona alınan oositler enzimatik (hyalüronidaz) ve mekanik yollarla denüstasyon işlemine tabi tutulur. Denüstasyon işlemi ile oositler kumulus ve korona hücrelerinden arındırılırlar. Bu işlemin yapılmasında iki amaç vardır. Birincisi oositin etrafındaki hücrelerin işlem sırasında ICSI pipetini tıkamasına engel olmak, ikincisi ise oosit matürasyonunun tam olarak tespit edilmesini sağlamaktır. Çünkü oosit etrafında bulunan kumulus hücreleri görüntünün net olarak izlenmesini engeller. Çıplak bırakılmış oositlerin zona pellusidaları, germinal vezikül ve ilk polar cisimcikleri, perivitellin aralıkları incelenerek oosit kalitesi değerlendirilir. ICSI işleminde haploid kromozoma sahip, 1. polar cisimciği gözlenebilen metafaz 2 (MII) oositler kullanılır. PVP içine zenginleştirme işlemi yapılan spermler konur. HEPES tamponlu damlalara da tek tek denüstasyon işlemi yapılmış olan oositler konur. OPU işleminden yaklaşık 4-6 saat sonra ICSI pipeti ile sperm kuyruğuna hafif bir bası oluşturularak immobilizasyon sağlanır. Sperm immobilize edilip pipet içine alındıktan sonra içinde oosit bulunan damlaya gidilir ve polar cisme mümkün olduğu kadar uzak bir noktadan oolemma delinerek ooplazmanın ortasına sperm yavaş bir ekspirasyon ile verilir. Fertilize olmuş oositin ilk değerlendirilmesi ICSI işleminden 16-18 saat sonra yapılmalıdır. Yapılacak ilk inceleme pronükleuslar ve kutup cisimciklerinin varlığı ve morfolojileri üzerine olur. Transfer edilecek embriyonun seçiminde en önemli

kriterlerden birisi blastomer sayısının gün ile uyumudur. İkinci gün kontrollerinde 2 ila 4 blastomerli embriyolar oluşmuş olmalıdır. Blastomerlerdeki nükleer fragmentasyonun <20 olması iyi kalitede embriyo olarak adlandırılmaları için gereklidir. Ancak fragmentasyonun hiç olmaması kalitenin çok daha iyi olduğu şeklinde değerlendirilebilir. Vakuolüzyasyonun bulunması değerlendirmede negatif kriterler arasında bulunmalıdır. Zona pellusidanın kalınlığı normal, rengi açık olmalı, perivitellin aralıkta debris bulunmamalıdır. Üçüncü gün yapılacak kontrollerde blastomer sayısının en az 7 veya 8 olması beklenir. Gelişimi çok iyi olan embriyolarda üçüncü günün sonunda kompaktlaşmanın başladığı görülebilir. Bu tür embriyoların gelişim potansiyeli ve başarılı implantasyon oranı fazladır. Dördüncü gün blastomerler arası bağlantı kompleksleri oluşur. Beşinci gün blastomerlerin arasında sıvı birikerek blastokist oluşur. Blastokistteki sıvı boşluğunun genişlemesi ile birlikte blastomerler iki farklı hücre grubunu oluştururlar. Zona pellusidanın altını çevreleyen hücre grubuna trofoblast denir. Merkezi olarak yerleşen blastomer grubuna iç hücre kitlesi adı verilir. Fetus iç hücre kitlesinden meydana geleceğinden dolayı embriyoblast adı da verilmektedir. Embriyo kalitesinin değerlendirilmesinde blastosel yapısı, iç hücre kitlesi, trofoblast hücrelerinin yapısı göz önünde bulundurulur. İç hücre kitlesinin değerlendirilmesinde hücrelerin sıkıca ve bir arada olması embriyo kalitesinin olumlu olduğunu gösterir. Trofoblastik doku çok sayıda hücre ve sıkı epitelyum içermelidir. Blastokist boşluğunun da büyük olması implantasyon oranlarını arttırır.

2.1.5.2. Kontrollü Overyan Hiperstimulasyon Protokolleri

İVF yöntemlerinde öncelikle KOH yapılarak overyan folikül gelişimi sağlanır. Elde edilen foliküller yaklaşık 18-20 mm çapa ulaştıklarında OPU işlemi ile yumurtalar toplanır ve hangi İVF yöntemi yapılacaksa işleme o şekilde devam edilir. Uterusa birden fazla embriyo verilerek gebelik hızının arttığının anlaşılmasıyla iyi kalitede yumurtaların seçilebilmesine imkan verecek ve mümkün olduğunca çok folikülün elde edilebileceği KOH rejimleri önem kazanmıştır. Agonist ya da antagonist protokol uygulanarak overyan foliküller rekombinan gonadotropinler kullanılarak belirli boyuta getirilirler. Gonadotropin başlangıç dozunun belirlenmesinde dikkate alınması gereken ve over cevabını belirleyen başlıca

faktörler; kadın yaşı, over rezervi, BMI, sigara ve önceki ovulasyon indüksiyonu ya da KOH'a verilen cevaptır. Her ne kadar hem FSH hem de LH normal foliküler estrojen sentezi için gerekse de süperovulatuvar sikluslarda FSH tek başına kullanılsa bile estrojen üretimini sağlayabilmektedir. Rekombinan FSH kullanılarak overyan folikül boyutları 18-20 mm oluncaya kadar TV-USG ile hastalar monitörize edilir. İstenilen boyutta folikül elde edildiğinde ise ovulasyon medikal olarak tetiklenir.

GnRH agonistleri (GnRHa)

GnRHa'nın in vivo kullanımının gonadotropinler üzerinde bifazik salınım yaptığı bulunmuştur. İlk olarak FSH ve LH'da ani salınım (flare up etki) olur, daha sonra gonadotropin releasing hormon (GnRH) reseptörü down regülasyonu ve hücre içi uncoupling ile pituiter desensitizasyon aşaması gelişir. Gonadotropin sentezindeki progresif azalma GnRHa kullanımı oldukça devam eder. Desensitizasyonun şiddet ve süresi doza bağlıdır. Yine doz ve formulasyona bağlı olarak ilaç bırakıldıktan sonra da endojen GnRH'a refrakter bir period oluşur. GnRHa'nın bu özellikleri iki tedavi protokolünde de kullanılmaktadır (21).

1. Kısa Dönem GnRHa Protokolü: Bu protokolde GnRHa erken foliküler fazda verilmeye başlanır. GnRHa'nın flare up etkisinden foliküler gelişim için yararlanır, daha sonra da günlük kullanımla pituiter desensitizasyon etkisinden yararlanır.

2. Uzun Dönem GnRHa Protokolü: Önceki siklusun luteal fazında ve erken foliküler fazda GnRHa verilmesi ile hem pituiter hem de over desensitizasyonu elde edilir. GnRHa enjeksiyonuna human koryonik gonadotropin (hCG) verilene dek devam edilir.

Randomize çalışmaların metaanalizinde GnRHa'nın İVF iptal oranını düşürdüğü, oosit sayısını ve klinik gebelik oranlarını arttırdığı bulunmuştur. Kısa ve uzun dönem protokolleri karşılaştırıldığında değişken sonuçlar elde edilmekle beraber metaanaliz çalışmalarında anlamlı fark olmadığı bildirilmektedir (22).

Başlıca GnRHa'leri leuprolide asetat, nafarelin asetat, buserelin asetatdır.

GnRH antagonistleri

Bu ilaçlar pituiter GnRH reseptörlerine yüksek afinite ile bağlanırlar ancak Ca^{+2} aracılı gonadotropin salınımını yapamazlar. Sonuçta LH üzerinde ilk flare-up etkisi olmadan güçlü kısa süreli supresyon yaparlar. Böylece desensitizasyon süresi gerektirmezler. Etkileri agonistlerden daha fazla olarak doza bağlıdır. Şu ana kadar 3 jenerasyon antagonist kullanılmıştır. Üçüncü jenerasyon antagonistlerden üzerinde en çok çalışılanları cetrorelix ve ganirelix'tir. GnRH antagonistleri ile ilgili iki tedavi rejimi mevcuttur:

1. Multiple doz GnRH antagonisti kullanımı: Siklusun 5 ya da 6. gününden başlayarak hCG gününe kadar düşük dozda günlük GnRH antagonisti enjeksiyonları yapılır (23).

2. Tek doz GnRH antagonisti kullanımı: Antagonist 8.günde ya da over cevabı hızlı ise daha önce kullanılır.

GnRH antagonistleri ile GnRHa uzun protokolleri karşılaştırmalı çalışmalarda sonuçlar tartışmalıdır. En azından çok merkezli çalışmalarda over folikül sayısı, toplanan oosit sayısı ve gebelik oranları antagonistlerde agonist protokolüne göre daha az bulunmuştur. Antagonist sikluslarda foliküllerin başlangıçta hızlı büyüdüğü ve E2 seviyesinin daha çabuk arttığı görülmüştür. Antagonist protokolünün kısa olması nedeni ile hasta uyumunun yüksek olması, kullanılan eksojen gonadotropin miktarının, overyan hiperstimulasyon sendromu (OHSS) sıklığının ve toplam maliyetin az olması da ek avantajlarıdır.

2.1.5.3. Ovulasyonun Tetiklenmesi

Overyan foliküller 18-20 mm çapa ulaştıklarında hCG kullanılarak ovulasyon tetiklenir. Piyasada iki çeşit hCG preparatı vardır. İlk preparat olan Pregnyl (Organon) idrardan elde edilmiştir. Bu preparat idrardan elde edilen preparatların ortak dezavantajlarını taşıdığından saf yapıda rekombinan teknolojiyle hCG (r-hCG) [Ovitrelle (Serono)] üretilmiştir. Bu ürünün 250 µg'ı, 5000 IU üriner hCG'ye eşdeğerdir. Çalışmalarda toplanan oosit sayısı ve matur oosit sayısı konusunda çelişkili sonuçlar olmakla beraber ortak nokta hCG sonrası serum PG konsantrasyonunun r-hCG ile daha yüksek olduğu yönündedir.

2.1.5.4. Luteal Faz Desteği

KOH sikluslarında GnRH'ın kullanılması ile CL fonksiyonunun anormal olduğu görülmüş ve luteal faz desteğinin önemi açığa çıkmıştır. PG'nin olduğu kadar estrojenin de PG reseptörü yenilenmesinde gerekli olduğu bilinmektedir. Bu nedenle CL'dan estrojen ve PG salınımına neden olması özelliğinden dolayı hCG kullanımını ileri sürülmüştür. Ancak yapılan klinik çalışmalara göre tek başına veya estrojenle kombine intramuskuler (im) PG ya da vajinal yolla verilen PG'a göre hCG'nin üstünlüğü olmadığı sonucuna varılmıştır. İntramuskuler PG vajinal yolla karşılaştırıldığında klinik gebelik oranı ve doğum oranı açısından daha etkili olduğu ve tüm tedavi formlarına göre oral progesteronun en etkisiz olduğu görülmüştür.

2.1.5.5. Tedavide Monitorizasyon

Monitorizasyondaki amaç foliküler maturasyonu kontrol etmek, hCG verilme zamanını tespit etmek ve siklusun geleceğini tahmin edebilmektir. Yüksek over cevaplılarda siklusu iptal ederek OHSS'yi engellemek, düşük cevaplıları tespit ederek tedavide ayarlamalar yapmak için monitorizasyon gereklidir. KOH takibinde serum E2, LH ölçümü ve TV-USG kullanılır. Klinik pratikte en sık kullanılan TV-USG ile folikül boyutunun takibidir. Serum E2 seviyesi her zaman folikül büyümesi ile korele değildir. Ayrıca değişken protokollerden dolayı optimal estrojen paterni tanımlanmamıştır. Yine de hangi protokol kullanılırsa kullanılsın E2 seviyesinde 3 günden fazla süre devam eden plato, siklustaki zayıf sonuçla ilişkilidir. Folikül boyutları 13-14 mm çapa ulaştığında veya E2 düzeyi 250 pg/ml seviyesine yükseldiğinde LH pikinin takip edilmesi gerekir. Bu ölçüm oosit toplanma saatinin ve prematür luteinizasyonun saptanması için bilgi sağlamaktadır. Foliküler büyümeyi TV-USG ölçümü ile değerlendirerek foliküler maturasyon ve hCG zamanlaması hakkında bilgi edinilebilir. USG'de en az 3 adet 16 mm folikül gözlendiğinde hCG enjeksiyonu önerilir. USG ile endometrial kalınlık ölçümü de en az 6 mm olmalıdır. Endometrial kalınlık <6 mm olduğunda gebelik oluşmadığı izlenmiştir.

2.2. Folikülogenezis ve Oosit Maturasyonu

2.2.1. Overin Yapısı ve Folikülogenezis

Gestasyonun altı ile sekizinci haftalarında germ hücreleri hızlı mitotik çoğalmaya başlar. Bu mitotik bölünme ile 16–20. haftalarda altı ile yedi milyon oogoniaya elde edilir. Bu sayı gonadın içerdiği maksimum oogonia sayısıdır. Bu dönemden sonra germ hücre sayısı giderek azalacaktır. Oogonilerin bir kısmı atreziye uğrarlar. Diğer kısım oogoniler ise ilk mayotik bölünmeye girip profaz 1 evresinde oositlere dönüşürler. 1.mayozun profaz evresinde duraklayan oogoniler artık primer oosit olarak adlandırılır (24). 18-20 haftalarda over medullasından orijin alan vasküler yapılar kortekse doğru ilerler. Bu ilerleme folikül yapımının başladığının göstergesidir (25). Primordiyal folikül, mayozun profaz 1 evresinde duraklamış olan bir oosit ve onun etrafında bir bazal membran tarafından çevrelenen tek katlı öncül granuloza hücrelerinden oluşur. Doğumda her iki overde toplam 1-2 milyon primordiyal folikül vardır. Bu sayı reproduktif dönemin başında 400 bine geriler.

Reproduktif dönemle beraber her siklusa belli miktarda folikül gelişmeye başlar. Öncül granuloza hücrelerinden oluşan tabakanın küboidal granuloza hücre tabakasına dönüşmesi ile primer folikül oluşur. Bu arada primer oositin salgılanan glikoproteinler sayesinde oosit etrafında koruyucu bir kılıf olan ZP oluşmaya başlar. Küboidal granuloza hücreleri daha sonra çok tabakalı hücrelere dönüşür. Bu arada ZP kalınlaşmaya başlar.

Granuloza hücrelerinin daha katlı tabaka alması ve folikülleri çevreleyen stromal hücrelerin teka denilen hücreleri oluşturmasıyla sekonder folikül oluşur. Teka hücreleri daha sonra teka eksterna ve interna olarak iki tabakalı hal alırlar. Teka internada kan damarları vardır. Teka eksterna ise over stroması ile devam eder. Bu folikül hücreleri arasında küçük hücreler arası boşluklar -Call Exner cisimcikleri- görülür. Bu aralıklar foliküler sıvı içerir. Bu sıvılar daha sonra birleşerek büyük bir boşluğu meydana getirirler. Bu boşluğa antrum adı verilir. Oosit ile folikül duvarı arasında kalan bir grup granuloza hücrelerine kumulus ooforus adı verilir.

Graff folikülü (Preovulatar folikül) 15-20 mm çapında, antrumu olan, primer oositin çevresinde korona radiata denen ZP'e sıkıca yapışmış tek sıralı granuloza derive hücreler içeren preovulatar foliküldür. Folikül hücrelerinin kendi arasında yaygın gap junctionlar vardır. Folikül hücreleri ile oosit arasında da hem gap junctionlar hem de oluklu bağlantılar bulunur. Bu bağlantılar aracılığı ile ovulasyondan 1-2 saat önce 1. mayoz tamamlanır ve bunun sonucunda sekonder oosit ve 1. polar cisim oluşur. Birinci polar cisim perivitellin aralık denen ZP ile oosit arasındaki aralığa atılır.

Oositin büyüme evreleri içinde graff folikülündeki granuloza hücreleri FSH reseptörlerinin yanı sıra LH reseptörleri de kazanırlar. Graff folikülü ovaryum yüzeyine doğru gelir ve stigma denilen bir çıkıntı yapar. LH piki ile teka eksterna ve tunika albugineadaki proteolitik etkinlik ile graff folikülü yırtılır. Ovule olan oosit fallop tüpleri tarafından yakalanır. Geriye kalan folikülün bazal membranı yırtılır, folikül hücreleri büzüşür, teka internadaki kan damarlarından antruma kan dolar ve pıhtılaşır. Böylece geçici bir yapı olan korpus hemorajikum oluşur. Daha sonra angiogenesis olur ve bu boşluğa fibroblastlar, kollajen lifler ve fibrin dolar. Oluşan yapıya CL adı verilir. Foliküler hücreler kazandıkları LH reseptörleri sayesinde lutein hücrelerine dönüşür ve steroid sentezleyen hücrelerin özelliklerini kazanırlar. FSH ve LH etkisi ile PG ve östrojen salgılamaya başlarlar. Teka interna hücreleri de teka lutein hücrelerine dönüşür ve LH etkisi ile androstenodion ve PG üretmeye başlarlar. Foliküler lutein hücreleri, teka lutein hücrelerinin LH etkisi ile ürettikleri androstenodionu kullanarak kendilerindeki aromataz enzimi ile E2 sentezlerler. Çünkü foliküler lutein hücrelerinde E2 sentezini sağlayacak tüm enzimler yoktur. CL büyümeye devam eder. Eğer fertilizasyon olmamışsa CL ovulasyondan yaklaşık 14 gün sonra gerilemeye başlar. Fertilizasyon olmuşsa büyümesine devam ederek PG ve östrojen üretimine trofoblastik dokudan salgılanan hCG etkisi ile gebeliğin 9-10. haftasına kadar devam eder. Eğer fertilizasyon oluşmamışsa CL luteoliz sonucu korpus albikansa dönüşür. Korpus albikans küçülerek ömür boyu ovaryumda kalır. Çok sayıda primer folikül bu şekilde olgunlaşmaya başlar ama yalnızca bir folikül gelişimini tamamlar. Gelişme sırasındaki herhangi bir zamanda diğer foliküller atreziye uğrarlar.

2.2.2. Oositin Büyüme-Gelişme ve Olgunlaşması

Reproduktif dönemle beraber gonadotropin uyarısı ile her siklusta belli miktarda folikül büyüme-gelişme ve maturasyon sürecine girer. Oositin büyümesi direk ilişkide olduğu granuloza hücrelerinin kontrolü altında olur. Büyüme evresi ile oosit 1. mayoz bölünmeyi tamamlama yetisi kazanır. Buna karşın spermin penetrasyonu, polispermiye blok oluşturması gibi özellikler ovulasyondan 1-2 gün önce kazanılır. Fertilizasyonun oluşması için spermler gibi oositler de olgunlaşma sürecini tamamlamış olmalıdırlar. Olgunlaşma sonucunda oositler fertilize olabilir, ikinci mayoz bölünmeyi tamamlar, polispermiye karşı koruyucu özellik gösterirler ve embriyoner gelişime devam ederler.

İlk başlarda primer oositin zarı (oolemma) düzgün görünümündedir. Zamanla oolemma ondüleli bir yapı kazanarak tüm yüzeyinde mikrovilluslar izlenir. Bu mikrovilluslar ZP'e uzanarak granuloza hücrelerinin stoplazmik uzantıları ile ilişki kurarlar. Bazı granuloza hücrelerinin uzantıları ise ZP'i geçerek oositle arasında oluklu bağlantıları oluştururlar.

Primer oositin büyümesi ile çekirdeği olan germinal vezikül (GV) de büyür. GV'nin zarı giderek porlu bir yapı halini alır. GV ancak oositin büyümeye devam etmesi ve çapının belli sınıra gelmesinden sonra 1. mayoz bölünmeyi tamamlar. Bu döneme mayotik güç denir ve bu dönem antral folikülün gonadotropinlere duyarlılığının arttığı dönemde gerçekleşir.

Primer oositteki granüllü endoplazmik retikulumdan (GER) kortikal granüller sentezlenir. Bunlar golgi aygıtında şekillenir. Kortikal granüller 300-500 nm çapında, yaklaşık 5000 tane olan, merkezlerinde elektron yoğun alan içeren, zarla çevrili yapılardır. Kortikal granüller oolemmmanın hemen altında bulunurlar. İşlevi polispermik fertilizasyona engel olmaktır. Fertilizasyondan sonra Ca^{+2} aracılı mekanizma ile eksozitoz yoluyla perivitellin aralığa geçerler (Kortikal reaksiyon) ve ZP'nin yapısını değiştirerek (Zona reaksiyonu) diğer spermlerin girişine engel olurlar.

Oositte ZP'i oluşturan 3 glikoproteininin sentezi yapılıdır. ZP, oositi dıştan saran, şeffaf, glikoproteinden oluşan, oositin kendi salgısı olan ekstraselüler bir yapıdır. Büyüyen oositin etrafında gözlenir, zamanla kalınlaşır ve preimplante embriyoları

çevreler. ZP'nin spermin oositi tanınmasında, spermin aktive olarak akrozom reaksiyonunu tamamlamasında, sperm ve oositin hücre membranı düzeyinde birleşmesinde, fertilizasyondan sonra polispermiye karşı blok oluşmasında, embriyonun uterusu doğru hareketinde, embriyonun çevresel faktörlerden korunmasında, embriyonun implantasyonunda önemli rolü vardır.

ZP'nin kalınlığı insanda ortalama 15 µm'dir. Oogeneziste başlardan itibaren salgılanmaya başlar ama oosit büyüdükçe kalınlığı artmaya devam eder. İmmatur oositlerde daha sıkı ve homojen iken oosit maturleştikçe fibrilo-granuler filamentöz bir yapı alır. Matur oosit yüzeyinde geniş ağlar oluşturur. ZP 1, ZP 2, ZP 3 olarak bilinen 3 glikoproteinden oluşur. ZP 3, primer sperm reseptörüdür. Sperm başına bağlanarak akrozom reaksiyonunu başlatır. ZP 2 akrozom reaksiyonunu tamamlamış spermlerin ZP'e bağlanmasını sağlar. Sperm membranı ile oolemma birleşmesinden sonra oolemmenin altındaki kortikal granüller Ca^{+2} aracılı mekanizma ile salınır ve ZP'de meydana gelen değişiklik ile diğer spermlerin girişi engellenir (ZP reaksiyonu). ZP preimplante embriyoların çevresinde bulunur. Ancak implantasyondan önce ayrılır (Embriyo Hatching). İVF' de implantasyonda başarı düşüklüğünün nedeni bu olabilir. Bu yüzden İVF'de ZP kimyasal ya da mekanik yollarla ya da lazer ışını ile kesintiye uğratarak (Asiste hatching) ZP' nin embriyo yüzeyinden ayrılması kolaylaştırılır.

Oosit büyüme ve gelişmesini izleyen üçüncü evre oosit maturasyonudur. Oositin stoplazmik özellikleri değişir, ovulasyon ve fertilizasyona hazırlanır. Maturasyonda ilk belirti GV membranının yıkılmasıdır. Böylece çekirdek içeriği ile stoplazma birbirine karışır. Kromozomlar stoplazmaya geçerek oosit periferine hareket eder ve mitoz mekiğini oluşturur. Mayoz bölünmenin devam etmesi Ca^{+2} 'nin tetiklediği bir mekanizma ile gerçekleşir. Foliküler hücrelerde sentezlenen oosit maturasyon inhibitörü (OMİ) oluklu bağlantılar aracılığı ile oosite geçer. OMİ, molekül kitlesi küçük bir proteindir. Oositin spontan mayoz bölünmesine engel olur. Oosit stoplazmasındaki maturasyon başlatan faktör (MPF), profaz 1 evresinde düşük seviyededir. Oosit maturasyon süreci içinde artarak MII evresinde en yüksek düzeye MPF, Cdc2-siklinB kompleksidir. MPF, mayotik bölünmenin profazını tamamlamak için GV'nin yıkımını sağlar.

Oosit maturasyonu sırasında 1. mayoz bölünmenin ve fertilizasyondan sonra 2. mayoz bölünmenin tamamlanması ile perivitellin aralığı sırası ile 1. ve 2. polar cisim atılır. Bu nedenle oosit maturasyonu incelenirken 1. polar cismin varlığı, fertilizasyon değerlendirilirken de 2. polar cismin bulunması önemlidir. 1. polar cisim kortikal granül içermesine rağmen, 2. polar cisimde bu yapı yoktur. Kortikal granül içermemesi 2. polar cismin kortikal granül reaksiyonundan sonra şekillendiğinin göstergesidir.

İVF tekniklerinde ovulasyon induksiyon teknikleri ile elde edilen oositlerin hepsi aynı maturasyon evresinde olmayabilir. Bu yüzden İVF'ten önce oosit maturasyonunu yapılmalıdır. ICSI'den önce immatur olan oositler kültüre edildiklerinde maturasyonlarını tamamlayarak enjekte edilebilecek duruma gelebilirler.

2.2.3. Oosit Kalitesine Etkili Faktörler

Kumulus-korona kompleksi ve oositin kendi morfolojik özellikleri oosit maturasyonunu belirleyen en önemli faktörlerdir. Oosit kalitesini değerlendirmede kullanılan oosit özellikleri:

1. Mayoz Bölünmenin Aşaması:

MII oositler olgun oositlerdir. 1. polar cisim varsa tanınırlar. 1. polar cisim perivitellin aralıkta bulunur. Bu oositlerde 1. mayoz bölünme tamamlanmıştır ve oosit 2. mayoz bölünmenin MII evresine kadar gelişimini sürdürmüştür. Oosit yuvarlak, açık renkli, parlak stoplazmalı, oolemma düzgün yüzevidir. Metafaz 1 (MI) oositlerde 1. polar cisim izlenmez, GV yoktur. Stoplazma hafif koyu renkli ve granülerdir. Maturasyonlarını in vitro 1-24 saat içinde tamamlarlar. Bu süre sonunda 1. polar cisim atılır. Profaz 1 oositler gerçek anlamda immatur oositlerdir. GV içerirler. Çekirdekte genelde iri bir çekirdekçik izlenir. Ooplazma daha koyu renklidir. İn vitro maturasyonlarını tamamlamaları uzun zaman alır. Önce GV dağılır, sonra 1. polar cisim görülür.

2. Oosit Stoplazma Özellikleri

Matur oositlerin stoplazması parlaktır ve homojen granülasyon gösterir. Granülasyon merkezde yoğun ise bu oositlerde fertilizasyon oranı düşüktür ve embriyolar kalitesizdir.

3. Ooplazmik Vakuoller

Ooplazmik vakuoller varsa oosit gelişimi optimal değildir. Ooplazmik vakuoller ışık mikroskobunda membranla çevrili boşluklar olarak görülür. Çapı 5 µm'den küçük ise fertilizasyon ve embriyoner gelişime etkileri çok olmazken çapı 15 µm'den büyük ise oositin gelişim dönemine ait defekti belirtirler.

4. Refraktil Cisimler

Bu cisimler fertilizasyona engel olurlar ya da fertilizasyon oranını düşürürler. Refraktil cisim varsa erken gelişim basamağında bir dejenerasyon vardır. Refraktil cisim içeren oositlerin fertilizasyon oranı %2.dolaylarındadır.

5. Oosit Şekli ve Çapı

OPU sırasında elde edilen oositlerin çok farklı şekilleri vardır. Bu değişik şekilli oositlerin nedeni oosit aspirasyonu sonrasında basıncın artması olabilir. Oosit çapı çok büyük ise fertilizasyon oranı düşüktür.

6. Polar Cisim Özellikleri

Polar cismin büyük olması oositin yaşlı olduğunu gösterir. Polar cismin yassı ya da parçalı olması fertilizasyonu etkilemese de embriyoner gelişimi olumsuz etkiler.

7. Zona Pellusida Özellikleri

ZP, normalde 15 µm kalınlığında, kesintisiz hücresel olmayan bir yapıdır. Tüm oosit yüzeyinde eşit kalınlıkta olmalıdır. ZP, oosit etrafında bir kısımda daha kalın ise fertilizasyonda sorun olmaz ama implantasyon sırasında oositten ayrılması zor olacağı için implantasyonu engeller. 30 µm'den kalın ise fertilizasyon ve implantasyon oranları çok düşüktür. ZP, sarı kahverengi veya kahverengi veya üzerinde kahverengi noktacıklar varsa fertilizasyon oranı düşer. ZP'deki hasar oositteki dejenerasyonu gösterir. ZP'nin bir yerde kesintiye uğramasına fractured ZP

adı verilir. Bazen ZP'deki açıklıktan ooplazma akabilir (empty zona) veya oolemma zonadan dışarı çıkıntı yapabilir.

8. Perivitellin Aralık

Oolemma ile ZP arasındadır. Düzgün, döküntü içermeyen polar cismin atıldığı boşluktur. Eğer döküntüler varsa bunlar fertilizasyon ve embriyoner gelişimi bozabilecek birikimler olarak kabul edilir.

Yapılan bazı çalışmalarda oositlerin bu özelliklerinden bir kısmına bakılarak oositler gradelenmiş ve yüksek kalitede olan oositlerin fertilizasyon oranlarının daha iyi olduğu ve iyi kaliteli oositlerden iyi kalitede embriyolar elde edildiği görülmüştür. Dolayısıyla klinik başarı oranları da artmıştır. Oositlerin özelliklerinin incelenmesi hangi oosite ICSI işlemi yapılacağı konusunda bilgi sağlayabilir. Ancak şu da bilinmelidir ki hiçbir oositin moleküler analizi fertilizasyon tahmininde objektif bir bilgi sağlamamıştır. Bu yüzden oositin çevresindeki foliküler sıvı ve granuloza hücresi gibi çevrenin araştırılması alternatif bir yöntem olabilir. Oositin etrafındaki yapısal çevrenin değişmesi ya da disfonksiyonu infertilite ile ilişkili olabilir. Oositin etrafındaki granuloza hücrelerinin yapısal özelliklerinin tanımlanması ve kuantitatif skorlanması fertilizasyon kabiliyetinin tahmin edilmesinde kullanılabilir (26). İVF kararından önce kumulus ooforus skoru ve oositin morfolojik olarak derecelendirilmesi başarılı bir fertilizasyon için prediktif ve objektif olan biomarkerlerdir (27). Günümüzdeki yayınlar kumulus ooforuslardaki gen ekspresyon profilinin kaliteli bir oosit ve embriyonun maturasyon ve fertilizasyonunda prediktif değerleri olduğunu göstermiştir(28, 29). Kumuluslardaki apoptozis insidansı oosit kalitesi ve İVF'de embriyo transfer başarısında kullanılmıştır (30). Fakat bu hücrelerdeki apoptozisin nedeni için daha ileri araştırmalara ihtiyaç vardır.

2.2.4. Oosit ile Granuloza Hücrelerinin İlişkisi

Oositler gelişim ve olgunlaşma süreçlerini foliküller içinde sürdürürler. Oositlerin büyümeye başlaması ile folikül hücreleri de büyüyerek ve çoğalarak granuloza hücrelerini oluştururlar. Bu hücrelerin bir kısmı gelişme döneminde oositin çevresine yerleşerek kumulus ooforus ve korona radiata hücrelerini meydana getirir. Foliküller içinde oositler büyüme periyodundan itibaren ZP ile çevrelenmiş

olarak bulunur. İlk bakışta oosit ve folikül hücrelerini ayıran bir yapı gibi görünen ZP, gerçekte bu iki hücrenin işlevsel bütünlüğünü sağlar. Korona radiata hücrelerinin stoplazmik bağlantıları ile oolemanın mikrovillusları arasında yaygın gap junctionlar vardır. Oosit ve granuloza hücreleri metabolik bir birliktelik oluşturur. Böylece iyonlar, aminoasitler ve küçük moleküller karşılıklı hareket ederler. Granuloza hücreleri ile çevrili olan oositler metabolik olarak daha aktiftirler. Granuloza hücreleri oositin metabolizma ve büyümesinin devamlılığını sağlar, oositin gelişim ve olgunlaşması için faydalıdır. Oosit stoplazmik maturasyonunu desteklerler (31). Bunu hem kendi aralarındaki hem de oositle aralarındaki yaygın gap junctionlar aracılığı ile yaparlar (32). Ayrıca mayoz bölünmeyi kontrol ederler. Özetle yumurtalık fonksiyonlarının düzenlenmesinde over granuloza hücrelerinin önemli rolü vardır. Foliküler granuloza hücrelerinin canlılığı oosit gelişimi için önemlidir. Yaşla beraber granuloza hücrelerinde hücre içine voltaj bağımlı Ca^{+2} kanallarından Ca^{+2} girişi ile apoptozis artar ve sonuç olarak oosit kalitesinde ve dolayısıyla doğurganlıkta azalma meydana gelir.

Granuloza hücreleri fertilizasyon için faydalıdır (31). Çünkü sperm için etkileyicidirler ve penetrasyon için kapasitasyonu artırır (33). Granuloza hücreleri oositi oksidatif stresin indüklediği apoptozisten korurlar (34). Oosit ve granuloza hücreleri yapısal ve işlevsel bir bütünlük oluştursa da canlılıklarını ve gelişimlerini birbirinden bağımsız olarak da sürdürebilirler.

2.3. Hücre İçi Kalsiyum Sinyali

2.3.1. Hücre İçi Kalsiyum Sinyali ve Önemi

Canlılarda gerçekleşen pek çok önemli olayda Ca^{+2} belirleyici rol oynamaktadır. Bu olaylar arasında hücre bölünmesi, apoptozis, oosit maturasyonu, oositin döllenme sonucu aktivasyonu sayılabilir. Bu özelliği ile pek çok fonksiyonu kontrol etmesi hücre içindeki kalsiyumun düzenli olarak ayarlanmasına bağlı olmaktadır. Ca^{+2} , hem hücre içi süreçlerde hem de hücreler arası etkileşimde önemli görevlere sahiptir. Hücre içi Ca^{+2} sinyali, hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunun geçici bir şekilde artışından oluşur. Ca^{+2} , bu sinyal oluşturma özelliğinden dolayı, hücre için bir ikincil habercidir.

2.3.2. Hücre İçi Kalsiyum Sinyalinin Oluşumu

Ca^{2+} 'un hücre içinde sinyal molekülü görevi görebilmesinin sebebi, hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunun $[Ca^{+2}]$ hem hücre dışı ortama, hem de hücre içinde Ca^{+2} depolayan yapılara göre çok düşük olmasıdır. Hem hücre içi ile dışı arasında hem de endoplazmik retikulum (ER) ile stoplazma arasında çok yüksek bir Ca^{+2} derişim farkı vardır (35). Hücre dışındaki $[Ca^{+2}]$ 'ı yaklaşık olarak 10^{-5} M, Ca^{+2} depolarında, örneğin ER'de 5×10^{-4} M civarlarında iken, $[Ca^{+2}]$ hücre içinde bu değerlerden binlerce kez daha düşük olan 10^{-7} M seviyelerindedir. Hücre içi Ca^{+2} sinyali, hücre içi $[Ca^{+2}]$ 'ın geçici bir şekilde artışından oluşur. Hücre dışından hücre içine yani stoplazmaya Ca^{+2} girişini sağlayan başlıca 3 tip Ca^{+2} kanalı vardır.

1. Voltaj Bağımlı Ca^{+2} Kanalları: Bu kanallar, membran depolarizasyonu sonucu aktive olur. Bu aktivasyon, kanalları Ca^{+2} 'a geçirgen hale getirir (36). Bu kanallar sayesinde hücre zarındaki elektriksel olaylar hücre içindeki fizyolojik olaylar ile ilişkilendirilir. 10 farklı voltaj bağımlı Ca^{+2} kanalı alt tipi bilinmektedir. L tipi, P tipi, Q tipi, N tipi, T tipi vs. İnsanda overyan foliküllerdeki granuloza hücrelerinde T ve L tipi Ca^{+2} kanalları identifiye edilmiştir. Özellikle T tipi Ca^{+2} kanalları aracılığı ile granuloza hücrelerinde FSH ve LH etkisi ile steroidogenez sağlanır. FSH ve LH hücre içi Ca^{+2} düzeyini direk olarak yükseltmez. Granuloza hücrelerinde üretilen yerel sinyal molekülleri (Asetilkolin, oksitosin, PG) aracılığı ile hücre içi depolardan Ca^{+2} açığa çıkar.

2. Ligand Bağımlı Ca^{+2} Kanalları: Bu kanallar, hücre dışından gelen ligandların bağlanması ile aktive olur ve Ca^{+2} 'a geçirgen hale gelirler. Bu yüzden bu kanallar aynı zamanda birer reseptördür. P2X purinerjik reseptörleri veya nikotinik asetilkolin reseptörleri bu kanallara örnektir. Bu kanalların bazıları, Ca^{+2} dışındaki katyonlara da geçirgendirler. Bu kanallar seçici olmayan katyon kanalları olarak adlandırılırlar.

3. Depo Boşalması ile Aktive olan Ca^{+2} Kanalları: Bu kanalların aktivasyon mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Hücre içi Ca^{+2} depoları, Ca^{+2} sinyali sonucu ya da daha farklı şekillerde boşaldığı zaman, bu kanallar hücre dışından sitoplazmaya Ca^{+2} girişine sebep olurlar (37). Bu Ca^{+2} girişi, kapasitatif

Ca^{+2} girişi olarak da adlandırılır. Bu kanallar, depo boşalması ile aktive olup hem Ca^{+2} sinyalinini, hem de hücre içi Ca^{+2} homeostazını düzenlerler.

Hücre içi Ca^{+2} depolarından Ca^{+2} çıkışını sağlayan yapılar 2 tanedir:

1. Ryanodin Reseptörleri(RyR): Kas hücrelerindeki ER olan sarkoplazmik retikulumdan Ca^{+2} salınımını sağlayan reseptördür. RyR doğrudan voltaj bağımlı Ca^{+2} kanallarından giren Ca^{+2} tarafından aktive edilir (36). Bu reseptörler Ca^{+2} ile zaman içerisinde önce aktive, ardından inhibe olmakta, aktif halde iken Ca^{+2} kanalı özelliği göstermektedirler. İnhibisyon durumu [Ca^{+2}] biraz daha arttırıldığı zaman aşıldığı için, adaptasyon olarak adlandırılmaktadır. Reseptörlerin Ca^{+2} ile aktivasyonu Ca^{+2} etkili Ca^{+2} salınımı olarak (CICR) adlandırılmaktadır.

2. İnositol 1,4,5-Trisfosfat Reseptörleri (IP₃): ER'den Ca^{+2} salınımına yol açan reseptörlerdir. Reseptörlerin protein yapısı, RyR'leri ile belirgin şekilde benzerlik taşımaktadır. Uyarılabilir olmayan hücrelerde, Ca^{+2} sinyalinini oluşturan temel mekanizma, IP₃ etkili Ca^{+2} salınımıdır. Hücre membranında bulunan reseptörlere agonistler bağlandığı zaman G-protein aracılığı ile fosfolipaz-C (PLC) aktive olur. Aktive PLC hücre membran fosfolipidlerinden olan fosfatidil inositol 4,5-bifosfatı (PIP₂), IP₃ ve diaçilgliserole (DAG) parçalar. Başka bir sinyal molekölü olan DAG, hücre zarında protein kinaz C (PKC) formunda kalırken, IP₃, ER'deki IP₃ reseptörleri aracılığı ile ER'den Ca^{+2} salınımına yol açar. IP₃ oluşumunu sağlayan PLC'nin çeşitli alt tipleri arasında en önemlilerden birisi PLC- β 'dir. Çeşitli G proteini alt tiplerinden biri olan Gq proteinleri ile kenet oluşturan reseptörler, ligandlar vasıtası ile uyarıldığında, heterotrimerik yapıda olan, G α ve G $\beta\gamma$ alt ünitelerinden oluşan Gq proteinlerinde, uyarılmamış durumda guanozin difosfat (GDP) bağlı olan G α altunitesinde, GDP/guanozin trifosfat (GTP) değiş tokuşu yaşanır. Aktive olan G α , PLC- β 'yi aktive ederek IP₃ oluşumunu sağlamış olur. Bu süreçte GTP'nin GDP'ye hidrolizi, G α 'nın tekrar G $\beta\gamma$ ile bir araya gelmesine yol açar, bu sayede sinyal bir sonraki döngüye dek sonlanmış olur.

2.3.3. Oosit Maturasyonunda Kalsiyumun Rolü

Primer oositler over korteksinde primordial foliküller içinde bulunurlar. Primer oosit mayoz bölünmenin profaz 1 evresinde olan oositir. Gonadotropin uyarısı ile primer oositler foliküller içinde gelişmeye başlarlar. Graff folikülü aşamasına gelindiğinde ovulasyondan önce mayoz bölünmenin devam etmesi Ca^{+2} 'nin tetiklediği bir mekanizma ile gerçekleşir. Foliküler hücrelerde sentezlenen OMİ oluklu bağlantılar aracılığı ile oosite geçer. OMİ molekül kitlesi küçük bir proteindir. Oositin spontan mayoz bölünmesine engel olur. Oosit stoplazmasındaki MPF, profaz 1 evresinde düşük seviyededir. Oosit maturasyon süreci içinde artarak MII evresinde en yüksek düzeye ulaşan MPF, Cdc2-siklinB kompleksidir. MPF, mayotik bölünmenin profazını tamamlamak için GV'nin yıkımını sağlar. Ovulasyondan hemen önce mayoz bölünme de tamamlanır ve 1.mayoz bölünmesini tamamlamış olan sekonder oosit ovulasyonla beraber ovaryumdan atılır ve fallop tüplerince tutulur.

2.3.4. Fertilizasyonda Kalsiyumun Rolü

Fertilizasyon yeteneğine sahip sperm hem maturasyon hem kapasitasyon işlemini sperm yumurta füzyonundan önce tamamlamalıdır. Maturasyon epididimlerde, kapasitasyon ise dişi üreme sisteminde meydana gelir.

Sperm başı 3 bölgeden oluşur:

1. Kondanse çekirdek: DNA'yı içerir.

2. Akrozomal kese: 3 bölgeden oluşur. Dış akrozomal membran, iç akrozomal membran, hidrolitik enzimler (hialüronidaz, akrozin). Akrozomal kesenin incelmış bölgesi kuyruğa doğru uzayarak ekvatoryal segmenti oluşturur.

3. Plazma membranı: ZP'e kuvvetli bağlanma yatkınlığına sahip sperm reseptörleri (ZP 3 glikoproteinine bağlanır) ve fertilin içerir. Fertilin, disintegrin protein ailesindedir. Fertilin akromozomun ekvatoryal bölgesinin ön tarafındaki sperm plazma membranının içinde yerleşmiştir.

Fertilizasyonda 4 olay meydana gelir:

1. Akrozom reaksiyonu: Plazma membranı ile dış akrozomal membran birleşir ve akrozomal enzimler açıklıklara doğru eksozitozla salınır. Korona radiataya yakın olan sperm akrozomundan hyaluronidaz salgılar ve bu enzim korona radiata hücreleri arasında bulunan hücreler arası maddeleri eritir.

2. ZP 3'e sperm bağlanması: İlk sperm ZP 3'e bağlanır. Bu bağlanma iç akrozomal membrandan akrozin salınımına neden olur. Akrozin sperm başının zona pellusidaya girişini kolaylaştırır.

3. Sperm yumurta füzyonu: ZP'i geçen ilk sperm, oositin plazma membranı ile birleşir. Oolemma altındaki kortikal granüllerin Ca^{+2} bağımlı eksozitozunu uyarır. Ca^{+2} aracılığı ile bu granüllerden salınan proteazlar sayesinde ZP 3'ten karbonhidratlar uzaklaşır ve başka bir sperm bağlanmasını önlemek için ZP 3, ZP 2'den kısmen ayrılır.

4. Plazma membran füzyonu: Sperm plazma membranında bulunan disintegrinlerce meydana gelir.

2.4. Oksidatif Stres

2.4.1. Serbest Radikaller

Atomlar, çekirdek ve çekirdeğin etrafında orbita denen yörüngelerinde spinleri birbirine zıt iki elektron içerirler. Bu elektronlara eşlenmiş ya da ortaklanmış elektron adı verilir. Atomlar yörüngelerindeki elektronlar eşlenmiş olduklarında kararlı yapı gösterirler. Serbest radikaller, son yörüngelerinde bir ya da daha fazla eşleşmemiş elektron taşıyan, kimyasal olarak çok aktif, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük, zararlı moleküllerdir. Yani serbest radikaller negatif yüklü elektron sayısının pozitif yüklü proton sayısına eşit olmadığı moleküllerdir (38). Oldukça kararsız olan bu moleküller, çevrelerindeki moleküllerle hızlı reaksiyona girme ve bu son yörüngelerindeki elektronlarını paylaşma eğilimindedirler. Son yörüngelerinde paylaşılmamış elektron bulunması serbest radikallerin reaktivitesini oldukça artırır (39).

Serbest radikaller başlıca 3 yolla meydana gelir:

1. Kovalent bağların hemolitik kırılması: Kovalent bağ taşıyan normal bir molekülün hemolitik yıkımı sonucu oluşurlar. Bölünme sonrası her bir parçada ortak elektronlardan biri kalır.

2. Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı ya da bir molekülün heterolitik olarak bölünmesi: Kovalent bağı oluşturan her iki elektron, atomlardan birisinde kalır.

3. Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi: Radikal özelliği taşımayan bir moleküle tek elektron transferi ile dış orbitalinde paylaşılmamış elektron oluşuyorsa bu tür indirgenme radikal oluşumuna neden olabilir.

Bu 3 tepkimeden biri oluştuğunda radikal olmayan türler radikal haline gelir. Serbest radikaller ile radikal olmayanların tepkimeleri sonucunda tepkimeye giren maddeler de serbest radikallere dönüşerek hasar zincirini ilerletirler.

Fizyolojik şartlarda serbest oksijen radikalleri hücrede mitokondrial respirasyon, hücrenin sinyal iletim sistemi ve bakteri fagositozu, karaciğerde detoksifikasyon işlemi gibi vücut için gerekli birçok fonksiyonun gerçekleşmesinde önemli rol oynar.

Serbest radikaller, hücrelerde endojen ve eksojen kaynaklı etmenlere bağlı olarak oluşurlar. Endojen etmenler organizmada normal olarak meydana gelen oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları ile oluşurlar. Oksijen, nitrik oksid, aktive nötrofil, mitokondriyal elektron transport sistemi, ER, peroksizom ve plazma membranı, araşidonik asit metabolizması başlıca endojen kaynaklardır. Eksojen kaynaklı etmenler arasında; diyet faktörleri, stres, çevresel faktörler (hava kirliliği), ilaçlar, ksenobiyotikler, zararlı ışınlar (x-ray, ultraviole vs.) yer alır.

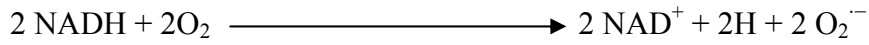
Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir (1). Oksijenin toksik etkisi yoktur ancak aerobik hücre metabolizması sırasında moleküler oksijen, ROT'a dönüşür, ROT'lar normal O₂ metabolizması sonucu oluşan süperoksit radikali (O₂⁻), hidrojen peroksit (H₂O₂) ve hidroksil radikalidir (OH⁻)

2.4.1.1. Süperoksit Radikali (O_2^-)

Eksojen ve endojen etmenler nedeni ile en çok ve en kolay oluşan oksijen radikalidir. Aerobik organizmalarda oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi ile süperoksit radikali oluşur (40).



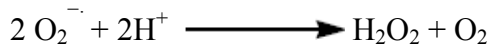
Süperoksit radikali, mitokondriyal elektron transfer zincirinde redükte nikotinamid adenin dinükleotidin (NADH) okside nikotinamid adenin dinükleotide (NAD^+) okside olması ile üretilir. Üretilen süperoksit radikali üretildiği yerde kalır.



Ayrıca pek çok oksidaz tarafından O_2^- üretilir. O_2^- , bir serbest radikal olmakla birlikte, kendisi direk olarak fazla zarar vermez. Asıl önemli olan, H_2O_2 kaynağı ve geçiş metal iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır. O_2^- , nötrofillerin bakterisidal aktivitesi, apoptozis, inflamasyon ve vasküler fonksiyonların regülasyonu gibi yararlı etkilere sahiptir. O_2^- düzeyi hücrede azalırsa bakteriyal enfeksiyonlar karşı yatkınlık olur. O_2^- düzeyleri artarsa O_2^- süperoksit dismutaz enzimi (SOD) ile H_2O_2 ve O_2 'e dönüştürülerek ortamdaki uzaklaştırılır.

2.4.1.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Hidrojen peroksit, oksijenin enzimatik olarak iki elektronla indirgenmesi ya da süperoksitlerin enzimatik / nonenzimatik dismutasyonu tepkimeleri sonucu oluşur.

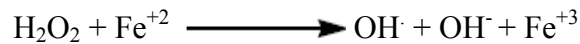


Esas üretim yolu O_2^- 'in dismutasyonudur. Bu tepkimede iki tane O_2^- yapılarına iki hidrojen atomu alarak SOD katalizörlüğünde H_2O_2 ve O_2 oluştururlar. H_2O_2 radikal olmayan reaktif oksijen türevlerindedir. Süperoksitin aksine hücre membranları arasında serbestçe difüze olabilen ve sitozole geçebilen uzun ömürlü bir oksidandır. Süperoksitin ulaşamadığı membranla korunan yapılara kolaylıkla ulaşabilir. H_2O_2 , fizyolojik pH ve ısıda ve metal iyonları yoksa stabil özellik gösterirse de özellikle proteinlerdeki hem grubundaki serbest demir (Fe^{+2}) ile reaksiyona girerse demir okside olurken hidroksil radikali oluşur (Fenton

reaksiyonu). Okside formdaki reaktif demir çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olup, hücre zarlarında lipid peroksidasyonu gibi radikal tepkimeleri başlatabilir. H₂O₂ aynı zamanda süperoksitle reaksiyona girerek reaktif ve zarar verici radikal olan hidroksil radikali oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir (Haber-Weiss reaksiyonu). Belirtilen potansiyel oksitleyici özelliği nedeniyle biyolojik sistemlerde oluşan H₂O₂'nin derhal ortamdaki uzaklaştırılması gerekir. Bu görevi, hücrelerdeki önemli antioksidan enzimler olan katalaz ve peroksidaz enzimleri yerine getirirler.

2.4.1.3. Hidroksil Radikali (OH[·])

Bilinen en reaktif oksidandır. Hidroksil radikali, Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonu sonucu hidrojen peroksitten oluşmaktadır (41).



Yarılanma ömrü çok kısadır. Aminoasitler, nükleik asitler, organik asitler, fosfolipitler ve şekerler gibi biyokimyasal maddelerin birçoğuyla reaksiyona girebilir (42). DNA ile tepkimesi sonucu DNA hasarı meydana gelir. İleri derecedeki DNA hasarları tamir edilemediğinden hücre ölümüne neden olur. Proteinler üzerinde oksidasyonla yapı değişikliği yaparak proteinler proteolitik yıkıma götürülür. Hidroksil radikalının başlıca hedefi yağ asitleridir. Zar lipidlerinin peroksidasyonu zarın yapısını bozar ve geçirgenliğini arttırıp hücre ölümüne neden olabilir (43).

2.4.2. Serbest Radikallerin Etkileri

Organizmada serbest radikal oluştuğu zaman bu radikallerin zararlı etkilerinden korunmak için antioksidan sistemler vardır. Serbest radikal oluşum hızı ile bunların antioksidan sistemler tarafından kaldırılma hızı bir denge içindedir. Bu denge sağlandığı sürece organizma, serbest radikallerden etkilenmemektedir. Bu radikallerin oluşum hızında artma ya da ortadan kaldırılma hızında bir düşme dengenin bozulmasına neden olur. Oksidatif stres olarak adlandırılan bu durum özetle, serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki ciddi dengesizliği göstermekte olup, sonuçta doku hasarına yol açmaktadır (44).

2.4.2.1. Oksidatif Stresin Proteinlere Etkisi

Proteinler hücrenin ve enzimlerin yapı taşıdır. Proteinler aminoasitlerden (aa) oluşmaktadır. Serbest radikallerin özellikle duyarlı aa'lar ile doğrudan etkileşimi sonucunda proteinlerde fragmantasyon, çapraz bağlanmalar ve agregasyon meydana gelerek hasar oluşur. Proteinlerin serbest radikallerden etkilenme düzeyleri içerdikleri aa'lara göre farklılık gösterir. Metionin, sistein gibi terminal sülfhidril grubu bulunduran aa'lar ile triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin gibi aromatik aa'lar, oksidasyona en fazla maruz kalan moleküllerdir. Proteinler oksidasyona uğradıkları zaman sekonder ve tersiyer yapılarında meydana gelen değişiklik sayesinde fonksiyonları etkilenir. Serbest radikaller, protein yapısındaki enzimlerin aktivitelerini değiştirir, membran taşıyıcı proteinlerini ve reseptör etkileşimlerini bozarlar (45).

2.4.2.2. Oksidatif Stresin Membran Lipidlerine Etkisi

Biyomembranlar ve hücre içi organeller (mitokondri, ER vs.) membran fosfolipidlerindeki doymamış yağ asitlerinin varlığı nedeniyle OS'e duyarlıdırlar (46). Lipid peroksidasyonu; serbest radikaller tarafından başlatılan ve membran yapısındaki çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna neden olan böylece membran lipid yapısını değiştirerek hücre yapı ve fonksiyonlarını bozan kimyasal bir olaydır (47). Yapısal hasarın derecesine göre, plazma membranının akışkanlığında azalma, membran geçirgenliğinde değişme, membran potansiyelinde azalma, membrana bağlı enzimlerin aktivitesinde azalma gözlenir. Lizozomal ve mitokondrial membranları ilgilendiren ileri derecede lipid peroksidasyonu ile organel içeriğinin hücre içine salınması sonucunda proteoliz hızlanır ve doku hasarı şiddetlenir. Membran geçirgenliği bozulursa potasyum ve magnezyum iyonlarının konsantrasyonları değişir ve böylece protein sentezinde inhibisyon gerçekleşir. Lipid peroksidasyonunda öncelikle lipid radikali oluşur. Lipid radikali de oksijenle reaksiyona girerek lipid peroksit radikalini oluşturur. Lipid peroksit radikali de diğer doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girer. Böylece zincirleme bir reaksiyon başlamış olur. Ayrıca lipid peroksitler ortamdaki hidrojen atomları ile de reaksiyona girerek lipid hidroperoksitleri oluştururlar. Lipid peroksitler daha sonra malondialdehit (MDA) ve 4-hidroksinonenal gibi yıkım ürünlerine dönüşürler.

MDA, proteinlerin amino gruplarına, fosfolipitlere ve nükleik asitlere bağlanarak toksik etkisini gösterir. Membran bileşenlerinde çapraz bağlanma ve polimerizasyona neden olur. Membranlardan kolaylıkla difüze olarak, DNA yapısında yer alan nitrojen bazlarla reaksiyona girer ve mutajen, karsinojen, genotoksik etkiler gösterir. Lipid peroksidasyonunun ölçümü doku hasarının iyi bir göstergesi kabul edildiğinden, peroksidasyon sırasında oluşan konjugelerin ölçümü, in vivo lipit peroksit düzeyini yansıtabilecek önemli bir yöntemdir.

2.4.2.3. Oksidatif Stresin Nükleik Asitlere Etkisi

Serbest radikallerin, farklı mekanizmalar ile deoksi ribo nükelik asit (DNA) üzerinde hasara yol açarlar. OH⁻ radikali deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girerek DNA'da hasara neden olur. DNA'nın temel yapı taşı olan nükleotidin yapısı içinde yer alan purin ve pirimidin bazları oksijen radikallerinin etkilerini gösterdiği bölgelerdir. Serbest radikaller özellikle bu bazlarda mutasyona neden olurlar. Özellikle guanin bazının bu radikaller aracılığı ile hidroksilasyonu sonucunda DNA molekülünün yapısı değişmekte ve mutasyonlar ortaya çıkmaktadır (48).

2.4.2.4. Oksidatif Stresin Karbonhidratlara Etkisi

Özellikle glikoz, mannoz ve deoksi şekerler fizyolojik şartlarda otooksidasyona uğrayarak O₂⁻ ve H₂O₂'i meydana getirirler. Okside glikoz, protein ile reaksiyona girer ve glikolizasyon ve glikasyon ürünleri oluşturur (49).

2.4.3. Antioksidan Savunma Sistemleri

Vücutta eksojen ya da endojen yol ile oluşan reaktif oksijen radikallerini ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için antioksidan savunma sistemleri vardır. Antioksidan savunma sistemleri ya serbest radikal oluşumunu engelleyerek ya da serbest radikallerin zararlı etkilerini önleyerek serbest radikallerin zararlı etkilerinden vücudu korurlar.

Antioksidanlar 4 farklı mekanizma ile oksidanları etkisizleştirirler:

1. Temizleme etkisi: Enzimler aracılığı ile oksidanları zayıf bir moleküle çevirirler.

2. Baskılama etkisi: Vitaminler ve flavinoidler aracılığı ile oksidanlara bir hidrojen aktarmakla oksidan maddeleri etkisiz hale getirirler.

3. Onarma etkisi: DNA tamir enzimleri, metiyonin sülfoksit redüktaz gibi enzimlerle hasarlı bölgeyi onarırlar.

4. Zincir koparma etkisi: Oksidanları bağlayarak fonksiyonlarını engellerler.

Antioksidanlar, endojen ve eksojen kaynaklı antioksidanlar olmak üzere başlıca iki ana gruba ayrılabilir:

A) Endojen antioksidanlar

1. Enzimatik antioksidanlar: Aktif merkezlerinde bakır (Cu), çinko (Zn), mangan (Mn), demir (Fe^{+2}), selenyum (Se) gibi metalleri içerirler. Düzeyleri genetik kontrol altındadır. Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz (GSH R), glutatyon-S-transferaz enzimatik endojen antioksidanlardır.

2. Non enzimatik antioksidanlar: Melatonin, seruloplazmin, transferin, miyogloblin, hemoglobin, ferritin, bilirubin, glutatyon, sistein, metiyonin, urat, laktoferrin, albümin non enzimatik endojen antioksidanlara örnektir.

B) Eksojen antioksidanlar:

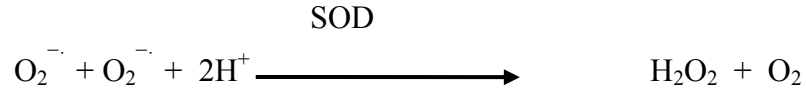
1. Vitaminler: α -tokoferol (vitamin E), β -karoten, askorbik asit (vitamin C), folik asit

2. İlaçlar: Ksantin oksidaz inhibitörleri, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH), rekombinant SOD, nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar, demir redoks döngüsü inhibitörleri, demir şelatörleri, sitokinler, barbitüratlar, nötrofil adezyon inhibitörleri

3. Eser mineraller: Se

2.4.3.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit radikali SOD ile H_2O_2 ve moleküler oksijene dönüşür. Antioksidan sistemin en önemli öğelerinden biridir.



İnsan hücrelerinde SOD'un başlıca 3 izoenzimi vardır :

1. Bakır ve çinko iyonu içeren SOD (CuZn-SOD): Sitozolde bulunur. En fazla bulunan SOD'dur.

2. Manganez iyonu içeren SOD (Mn-SOD): Mitokondride bulunur.

3. Ekstraselüler SOD (EC-SOD): Vasküler endotele bağlı olarak bulunur. Kofaktörleri CuZn-SOD gibi bakır ve çinkodur.

2.4.3.2. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)

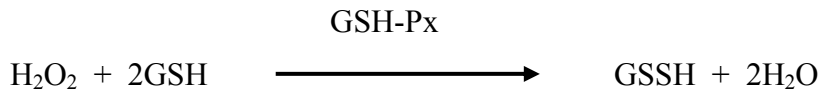
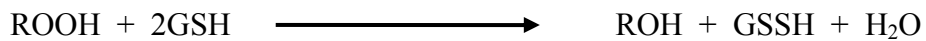
Süperoksit radikalinin temizlenmesi sonucu ya da başka tepkimeler sonucu oluşan H_2O_2 ve yağ asidi hidroperoksitlerinin (ROOH) indirgenmesinde rol alan enzimdir. Fonksiyonel olarak önemli selenoprotein grubundandır (50). Tüm dokularda bulunmakla beraber en fazla karaciğer ve eritrositlerde aktivite gösterir. Hücre içinde ise sitozol ve mitokondride en yoğun olarak bulunmaktadır (51).

İnsan dokularında iki GSH-Px formu vardır:

1. Se-bağımlı GSH-Px: H_2O_2 ve ROOH'leri metabolize eder.

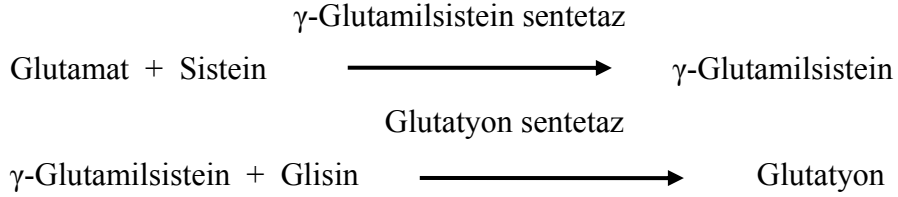
2. Se-bağımsız GSH-Px: Sadece ROOH'leri metabolize eder.

GSH-Px, ROOH'ları ve H_2O_2 'i metabolize ederken okside şekline dönüşür. (GSSG). Okside glutasyon ise glutasyon redüktaz (GSH R) tarafından tekrar GSH'a indirgenir. Bu reaksiyon pentoz fosfat yolunda üretilen NADPH'a bağımlıdır. (51, 52).



2.4.3.3. Glutasyon (GSH)

GSH, glutamat, sistein ve glisin aminoasitlerinden karaciğer başta olmak üzere pek çok dokuda sentezlenen düşük molekül ağırlıklı bir tripeptittir. Hücreleri oksidan hasara karşı koruyan hücre içindeki en önemli antioksidan bileşiktir. Sentezde γ -glutamilsistein sentetaz ve GSH sentetaz enzimleri katalizördür (52).



Hücre içinde önemli bir antioksidan olan GSH'nin %99'dan fazlası indirgenmiş formda bulunur. Glutasyonun pek çok metabolik görevi vardır. GSH-Px, GSH-R ve GSH transferaz gibi enzimlerin kofaktörüdür. Proteinlerdeki sülfhidril (-SH) gruplarını redükte halde tutar ve bu grupları oksidasyona karşı korur, böylece fonksiyonel proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller. GSH, yabancı bileşiklerin detoksifikasyonu ve aminoasitlerin membranlardan transportunu da sağlar. Vitamin C ve E gibi önemli antioksidanları yeniden oluşturup aktif formlarını destekler. Hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşümünün engellenmesinde rol alır (53, 54). GSH-Px enzimi ile hidrojen peroksit radikali ortadan kaldırılırken GSH'dan okside formu olan GSSG oluşur. GSSG hücrelere toksiktir ve GSH-R enzimi aracılığı ile GSH'a indirgenir ve böylece hücrede GSH/GSSG oranı sabit tutulmaya çalışılır (55). GSH/GSSG oranı, iyi bir oksidatif stres göstergesidir (56, 57).

2.4.4. Granuloza Hücreleri ve Oksidatif Stres

Kadın reproduktif sisteminde ROT ve antioksidanlar folikülogenezis, oosit maturasyonu, luteal regresyon ve fertilizasyonda fizyolojik rol oynarlar (58). Granuloza hücreleri antioksidanları üreterek oositi ROT'ların zararlı etkilerinden korurlar. Yardımcı üreme tekniklerinde elde edilen başarı oranları gamet ve embriyo kalitesi tarafından etkilenir. Foliküler sıvı ve granuloza hücreleri oositle yakın ilişkide olduklarından bunların incelenmesi ile elde edilen sonuçlar İVF başarısını

tespit etmede kullanılabilir. Örneğin granuloza hücrelerindeki geliştirilmiş ROT üretimi (2) düşük oosit fertilizasyon kabiliyeti, düşük embriyo kalitesi ve azalmış implantasyon oranları ile ilişkili bulunmuştur. Sonuçta oksidatif stres üreme ve gelişme patolojisi ile ilişkili gibi durmaktadır. Granuloza hücrelerindeki antioksidan enzimler oosit maturasyonunu düzenler ve yardımcı üreme tekniklerindeki başarı oranları ile ilişkilidir. Üreme ve fertilizasyonun düzenlenmesinde ROT ve antioksidanların önemi dikkate alınmalıdır.

3. MATERYAL METOD

Bu çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum İVF Ünitesi ve Biyofizik Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından 1960-TU-09 proje numarası ile desteklenmiştir.

3.1. Materyal

Granuloza hücreleri SDÜ Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı İVF ünitesine başvuran hastalardan rekombinant FSH tedavisi ile geliştirilen foliküllerden OPU işlemi sonrası oosit etrafındaki korona radiata tabakasının alınması ile elde edildi. Elde edilen granuloza hücrelerinden SDÜ Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı Laboratuvarında hücre içi Ca^{+2} sinyali ve antioksidan sistem düzeyleri bakıldı. İşaretlenen oosit mayoz bölünmenin aşamasına, polar cismin özelliğine, stoplazmik granülasyona, perivitellin aralığa ve zona pellusidanın özelliğine göre gradelendi ve oositin ICSI işlemi ile fertilize olup olmadığı takip edildi.

3.1.1. Kullanılan Malzemeler ve Aletler

1. Soğutmalı santrifüj: Kubota (Japonya)
2. Laminar Flow Kabini: Jouan B4I (Fransa)
3. Derin dondurucu: Uğur (Türkiye)
4. Hassas terazi: Scaltec SPB 32 (İsviçre)
5. Vorteks: Nüve NM 100 (Türkiye)
6. Otomatik pipetler: Eppendorf (Almanya), Gilson (Fransa)
7. Spektrofotometre: Shimadzu UV 1601 (Japonya)
8. pH metre: Hanna Instruments (Portekiz)
9. Manyetik karıştırıcı: Nüve (Türkiye)
10. Floresan spektrofotometre: (Cary Eclipse, Varian Firması, Avustralya)

11. CO₂ inkübatör: (Heal Force, Smart Cell, Japonya)
12. Logio 200 marka USG cihazı
13. 6,5 MHz'lik vaginal prob
14. ICSI pipeti
15. Petri kabı

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

1. Tris, Merck (Almanya)
2. Glisin, Merck (Almanya)
3. Sodium Chloride, Merck (Almanya)
4. Tween 20, Merck (Almanya)
5. Bovin Serum Albumin, Merck (Almanya)
6. EDTA, Merck (Almanya)
7. EGTA, Merck (Almanya)
8. Leupeptin, Sigma (Almanya)
9. Triton X-100, Sigma (Almanya)
10. Metanol, Merck (Almanya)
11. Hidroklorik Asit, Merck (Almanya)
12. Histopaque REF-11191 (Amerika Birleşik Devletleri)
13. Bradford Kimyasalı Bio-Rad 500-0006 (Almanya)
14. HEPES tamponu

3.2. Metod

Çalışmamıza Ocak 2010-Şubat 2011 tarihleri arasında Süleyman Demirel Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Ana Bilim Dalı Tüp Bebek Merkezine İVF tedavisi için başvuran 33 infertil hasta dahil edildi. Çalışma prospektif ve tek merkezli olarak planlandı. Hastalardan çalışmaya katılmaları için yazılı onam alındı.

Çalışma öncesinde Akdeniz Üniversitesi Akdeniz Tıp Fakültesi Etik Kurulunca B.30.2.AKD.0.20.05.05/192 sayılı kararla çalışmanın gerçekleştirilmesinde etik sakınca olmadığına karar verildi.

3.2.1. Hastaların Seçimi

Hastaların genel muayene, fizik muayene ve jinekolojik muayeneleri yapıldıktan sonra tüm hastalardan mensin 3. günü hormon profili (Bazal FSH, LH, progesteron, estradiol, prolaktin, tiroid stimulan hormon) bakıldı. Tüm hastalara adet 7-10. günleri arasında HSG çekildi. Üroloji bölümünden konsültasyon istenerek eşlerinden 3 gün cinsel perhizden sonra sperm analizi yapıldı. Hastalara tedavi öncesi siklusun erken foliküler fazında TV-USG yapılarak overyan foliküllerin çapı ve sayısı değerlendirildi ve overyan gradeleme yapıldı. Yapılan TV-USG’de endometrial kalınlık da kaydedildi. Bunun için Logio 200 marka USG cihazı ve 6,5 MHz’lik vaginal prob kullanıldı.

Hastaların infertilite değerlendirilmesinden sonra demografik özellikleri alındı. Tüm hastaların yaş, meslek, infertilite süresi, sigara, alkol kullanımı, ek hastalık varlığına göre demografik özellikleri kaydedildi.

Çalışmaya dahil edilme kriterleri

1. İnfertilite nedeninin erkek faktörü olmaması
2. Ek hastalık olmaması (Hipotirodi, hipertirodi, hiperprolaktinemi, diabetes mellitus)
3. Sigara, alkol, ilaç kullanmayan hastalar
4. 25-35 yaş arası infertil çiftler
5. Primer infertil olanlar
6. Açıklanamayan infertilitesi olanlar
7. OPU işleminde 5 veya daha fazla folikül gelişen hastalar

Hastaların açlık kan şekeri, üre, alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST), hemogram (12 saatlik açlık süresini takiben, 10 ml venöz kan örnekleme yapılarak) ölçümleri yapılarak ve elektrokardiyografi (EKG) ve

akciğer filmleri çekilerek anestezi doktoru tarafından konsülte edildi. Preoperatif anestezi almasında sakınca olmadığı gösterildi.

3.2.2. Oositlerin Gelişimi

Hastaların ilk değerlendirilmesinin ardından yaş, antral folikül sayısı, kilo ve bazal FSH değerleri göz önüne alınarak verilecek rekombinant FSH ünitesi hesap edildi. GnRH agonisti ile uzun protokol veya GnRH antagonist ile kısa protokol başlandı.

Gonadotropin salgılatıcı hormon agonisti ile uzun protokol uygulanan olgularda gonadotropin başlanmadan önceki siklusun mid-luteal fazında (21.gün) 0.5 mg/gün leuprolide asetat (Lucrin flakon® 1mg Abbott, Türkiye) veya 0.1 mg triptorelin asetat (Decapeptyl enjektabl® 0,1 mg Ferring, Türkiye) başlandı. Over baskılanması için serum E2 konsantrasyonu <50 pg/ml ve overde >10 mm folikül olmaması kriterleri kullanıldı. Siklusun 3.gününde uygun dozda gonadotropin ile stimülasyon başlandı ve leuprolide asetat veya triptorelin asetat dozu yarıya düşürülerek gonadotropin tedavisi boyunca aynı dozdan devam edildi.

Antagonist protokol uygulanan olgular menstrüal siklusun 3. günü hormonal ve sonografik olarak değerlendirildi. Sonografik olarak foliküler veya korpus luteum kisti saptanmayan ve hormon düzeyleri normal sınırlarda olan hastalara siklusun 3. gününde uygun dozda gonadotropin stimülasyonuna başlandı. Önde giden folikül 13 mm çapa ulaştığında ya da E2 > 800 pg/ml olduğunda cetrotrelis 0,25 mg/gün s.c (Cetrotide flakon® 0,25 mg, Merck Serono, İstanbul, Türkiye) veya ganirelix 0,25 mg/gün sc (Orgalutran kullanıma hazır enjektör® 0,25 mg, Schering Plough, İstanbul, Türkiye) başlanarak hCG gününe kadar gonadotropinlerle birlikte kullanıldı.

Tüm hastalarda gonadotropin başlangıç dozu hastanın yaşına, over rezervine ve daha önceki stimülasyon rejimine olan cevabına göre bireysel olarak belirlendi. Siklusun 3. günü overyan foliküler aktivite transvaginal ultrasonografi ile değerlendirildi ve 10–15 mm'den büyük folikül kisti saptanmayan olgulara gonadotropin stimülasyonu başlandı Stimülasyonda rekombinant FSH (Gonal-F® RFF Pen -follitropin alfa injection, Merck Serono, İstanbul, Türkiye; Puregon®

Schering-Plough, İstanbul, Türkiye) veya üriner FSH (Menogon 75 U ampul, Ferring, İstanbul, Türkiye) kullanıldı. Folikül gelişiminin takibi amacıyla gonadotropin tedavisinin 5. gününde ultrasonografi sonucuna göre gonadotropin doz ayarlaması yapıldı.

3.2.3. Tedavinin Monitorizasyonu ve Oosit Pick-up İşlemi

Ultrasonografik takipler sonucunda iki veya daha fazla folikül >17 mm olduğunda rekombinant hCG (Ovitrelle® PreFilled Syringechoriogonadotropin alfa injection, 250 mikrogram, Merck Serono, İstanbul, Türkiye) uygulandı. Hasta takip formlarına her kontrolde folikül sayısı ve endometrium kalınlığı kaydedildi. Hastalar rekombinant hCG (Ovitrelle® PreFilled Syringechoriogonadotropin alfa injection, 250 mikrogram, Merck Serono, İstanbul, Türkiye) uygulamasından yaklaşık 36 saat sonra genel anestezi altında litotomi pozisyonunda OPU işlemine alındı. OPU işlemi sırasında hasta litotomi pozisyonunda steril örtüler ile örtüldü. Vagene spekulum yerleştirildi. Vagen steril serum fizyolojik ile yıkandı. Çift lümenli 17 mm ve 30 cm boyutlarında oosit aspirasyon iğnesi kullanılarak transvajinal yoldan oosit toplama işlemi uygulandı.



Şekil 1. Oosit pick-up işlemi sırasında overin ultrasonografik görünümü

3.2.4. Oositlerin Gradelemesi

OPU işlemi ile alınan oositlerde 4 parametreye bakıldı. Bu parametreler:

1. Stoplazmik granulasyon
2. Polar cismin özellikleri
3. Perivitellin aralık
4. Zona pellusida özellikleri

Oositler bu 4 parametrenin her birine 0 ile 1 puan verilerek en az 0 en çok 4 puan olmak üzere gradelendirildi. 4 puan alan oositler iyi kalitede oosit (grade A), 2-3 puan alan oositler orta kalitede oosit (grade B), 0-1 puan alan oositler kötü kaliteli oosit (grade C) olarak değerlendirildi.

Tablo 3. Oosit gradelemesi.

	0	1
Stoplazmik granulasyon	Merkezi Granulasyon	Homojen Granulasyon
Polar cisim özellikleri	Fragmante, büyük	Non-fragmante, normal büyüklükte
Perivitellin aralık	Döküntü var	Döküntü yok
Zona pellusida özellikleri	>15 μ , kesintili, düzgün değil	15 μ , düzgün yüzeyli

3.2.5. Granuloza Hücrelerinin Elde Edilmesi

Çalışmamız için alınan folikül ve içeriği petri kabına konuldu. Mikroskop ile bakılarak kumulus ve oosit içeriği HEPES'li medium içeren başka bir petri kabına alındı. Kumulus hücreleri mekanik olarak iğne yardımı ile oositten ayrıldı. Alınan oosit işaretli bir şekilde kültüre edileceği yere konuldu. Mediumlu kumulus kompleksi alınarak biyofizik laboratuvarına götürüldü.

3.2.6. Granuloza Hücrelerindeki İntrasellüler Kalsiyum Sinyalinin Değerlendirilmesi

Granuloza hücreleri hücre içi kalsiyum miktarının ölçümü için 37 ⁰C de 45 dakika boyunca 4 μ M Fura-2 AM floresan boyası ile boyandı (59). Boyanma işleminden sonra yıkamaya tabi tutulan hücreler manyetik olarak karıştırılan, şeffaf

küvetlere hücre yoğunluğu 2×10^6 olacak şekilde Na^+ -HEPES [(mM cinsinden) NaCl, 140; KCl, 4,7; CaCl_2 , 1,2; MgCl_2 , 1,1; glukoz, 10 ve HEPES, 10 (pH 7,4)] solüsyonu içerisinde floresan spektrofotometre (Varian Cary Eclipse, Australia) cihazındaki haznesine yerleştirildi. Fura-2 AM için eksitasyon dalga boyları 340 nm ve 380 nm, emisyon dalga boyu 505 nm dalga boyundaki floresan ışık ile uyarıldı ve yaklaşık altı dakika boyunca kayıt alındı. Hücre içi serbest Ca^{+2} iyon düzeyi değişimleri bilgisayar ekranında 340 nm/380 nm dalga boylarındaki uyarımları ile kaydedildi (60) ve Grynkiewicz ve arkadaşlarının metoduna göre hesaplandı (61).

3.2.7. Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Ölçümü

Medium içerisinde korunan granuloza hücrelerinden Biyofizik Anabilim Dalı laboratuvarlarında lipit peroksidasyon analizi (MDA), GSH-Px aktivitesi ve indirgenmiş glutatyon (GSH) analizleri yapıldı.

3.2.7.1. Lipit Peroksidasyon Analizi

Granuloza hücrelerinde lipit peroksidasyon düzeylerinin belirlenmesi, Placer ve arkadaşlarının (62) bildirdikleri yöntemle göre tiyobarbitürik asit (TBARS) reaksiyonu ile son derece hassas bir spektrofotometrede (Shimadzu, UV-1800, Japonya) yapıldı.

Deneyin yapılışı: Tüm granuloza hücre grupları 1/9 (2.25 ml) oranında TBARS solüsyonu ile sulandırıldı. Kör olarak ise 0.25 ml fosfat tamponu ile 1/9 oranında TBARS karışımı kullanıldı. Örnekler ve kör, 20 dakika süresince 100°C 'lik su banyosunda tutuldu. Daha sonra çeşme suyu altında soğutuldu. 2500 devirde 5 dk santrifüj edildi. Üstteki pembe renkli sıvı otomatik pipetle hassas bir şekilde alınarak 1cm ışık geçişine sahip küvette 532 nm dalga boyundaki spektrofotometrede köre karşı okundu. Standart olarak ise yine aynı oranlarda hazırlanmış 1, 1, 3, 3 tetraethoxy propane solüsyonu kullanıldı. Değerler mikromol/gram protein olarak belirlendi. Sonuçlar nanomol/ gram protein olarak verildi.

3.2.7.2. İndirgenmiş Glutasyon (GSH) ve Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Analizleri

GSH düzeyleri Sedlak and Lindsay'in (63) bildirdikleri yönteme göre spektrofotometre cihazı ile belirlendi. GSH tayini için gerekli solüsyonlar;

1- %10 trikloroasetik asit (TCA) solüsyonu

2- Tris tamponu (0,4M pH:8,9): 48,46 gram tris-hidroksimetil-aminomethan'ın hidroklorik asit (HCl) ile pH 8,9 olacak şekilde 1 litrede çözülmesi ile hazırlanır.

Deneyin yapılışı: 0,1 ml hücre homojenatı 0,4 ml TCA solüsyonu ile karıştırıldı. 20 sn karıştırıcıda vortekslendi ve 3000 rpm de 5 dk santrifüj edildi. 0,1 ml süpernatant temiz bir tüp içine alındı. Üzerine 0,9 ml distile su, 2,0 ml Tris tamponu ve 0,1 ml DTNB solüsyonu eklendi. Oluşan sarı renk distile suya karşı spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda okundu.

GSH-Px enzim aktiviteleri Lawrence ve Burk (64) tarafından bildirilen yönteme göre spektrofotometrede belirlendi.

Kullanılan Solusyonlar:

1- Tris (1) HCl tampon solusyonu (50 mM) pH:7,6

2- GSH solüsyonu

3- CHPO (Kumen-hidroperoksit) solüsyonu

4- %10 TCA solüsyonu

5- Tris (2) tampon 0,4 M pH: 8,9

6- DTNB solüsyonu

Tablo 4. GSH-Px deneyinin analiz şeması ve kullanılan kimyasallar.

Kimyasallar	Kontrol	Örnek
Hücre homojenatı	0.5 ml	0.5 ml
Tris HCl tamponu eklendi.	0.3 ml	0.3 ml
CHPO ilave edildi.	-	0.1 ml
GSH (her tüpe 5 sn aralıklarla konuldu.)	0.1 ml	0.1 ml
Oda ısısında tam 10 dakika beklendi.		
TCA (her tüp için 5 sn aralıklarla konuldu)	1.0 ml	1.0 ml
2500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.		
Üstteki süpernatant temiz bir tüpe alındı.		
Üzerine Tris tampon eklendi.	2.0 ml	2.0 ml
DTNB eklendi.	0.1 ml	0.1 ml

Oda ısısında 5 sn beklendi. Saf suya karşı spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda okundu.

Protein Tayini

Çalışmamızda yapılan protein tayini deneyleri tüm örneklerde Lowry ve arkadaşlarının tanımladığı yöntemle göre yapıldı (65).

3.2.8. ICSI İşlemi ve Embriyo Transferi

Aynı gün hastanın eşinden mastürbasyon yoluyla elde edilen spermlerin likefaksiyon sonrası sayı ve motilitesi değerlendirildi. Her hastada kocasının spermleri kullanıldı. Alınan spermler swim-up veya gradient yöntemlerinden geçirildikten sonra modifiye insan tubal sıvı medyum (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) ile yıkanarak hazırlandı. Oositler petri kabında %7 sentetik serum ilave edilmiş modifiye insan tubal sıvı medyum (Irvine Scientific) 37 °C'de ve %5 CO₂ ortamında inkübe edildi.

Fertilizasyon ertesı gün embriyoloji laboratuvarında değerlendirildi. Oositler iki ayrı ya da fragmente polar cisimcik taşıyorsa ve nukleolus içeren iki pronukleus içeriyorsa fertilize kabul edildi. Embriyolar 2. ve 4. günde tekrar değerlendirildi. İkinci günde 4, 3. günün sabahında 8 hücre aşamasına gelme normal olarak değerlendirildi. Nükleer fragmentasyon olmayan embriyolar grade 1 (iyi kaliteli) embriyo, fragmentasyon oranı %20 ise grade 2 embriyo, eğer nükleer fragmentasyon oranı %21-50 ise grade 3, >%50 ise grade 4 (kötü kaliteli) embriyo olarak değerlendirildi. Grade 1, 2, 3 embriyolar Wallace kateteri (H.G. Wallace Ltd., Colchester, Essex, İngiltere) ile TV-USG eşliğinde transfer edildi. Hastanın yaşı ve elde edilen embriyoların sayısı ve kalitesi göz önüne alınarak 1-3 arası embriyo transfer edilmistir. Mart 2010 da çıkan yasadan sonra hastalara single embriyo transferi (SET) yapılmaya başlandı. ten fazla embriyonun geliştiği olgularda öncelikle grade 1-2 embriyolar transfer için tercih edildi. Tüm hastalara luteal destek sağlamak amacıyla yumurta toplama gününden 1 gün sonra başlayarak intravaginal progesteron jel (Crinone® %8 gel, Merck Serono, İstanbul, Türkiye) uygulanmıştır. Ayrıca tüm hastalara yumurta toplama gününden başlayarak embriyo transfer gününe kadar günde iki kez oral doksisisiklin 100 mg tedavisi başlandı.

3.2.9. İstatiksel Analiz

İstatiksel analizlerde ortalama, standart sapma, minimum ve maksimum değerleri hesaplanmıştır. Karşılaştırmalarda Mann-Whitney-u, ki-kare, Fisher's ki-kare testleri kullanılmıştır. Verilen ilaç protokolu ile GSH-Px, GSH, MDA, Ca⁺² düzeyleri arasındaki ilişki Mann Whitney-u testi, kullanılarak fertilizasyon ile Ca⁺² ve antioksidanlar arasındaki ilişkisi Mann Whitney-u.testi, grade ile fertilizasyon ilişkisi ki kare testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Grade B ve grade C oositlerde fertilizasyon oranı, grade A ve C oositlerde fertilizasyon oranı, Grade A ve grade B oositlerde fertilizasyon oranı karşılaştırmasında Fischer's ki-kare testi kullanılmıştır. Oosit gradelerine göre Ca⁺² ve antioksidan değerlerinin ilişkisi Mann Whitney-u testi, uygulanan ilaç protokolünün fertilizasyon ile ilişkisi Fischer's ki-kare testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. p <0,05 ise anlamlı kabul edilmiştir. İstatiksel analizler SPSS 15.0 paket programı kullanılarak yapılmıştır.

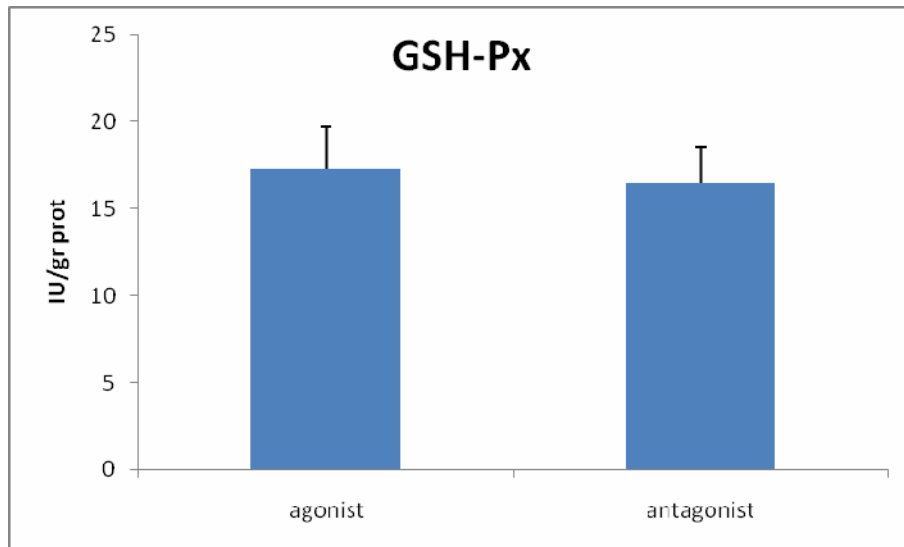
4. BULGULAR

Tablo 5. Verilen ilaç protokolu ile GSH-Px aktivitesi, GSH, MDA, Ca²⁺ düzeyleri arasındaki ilişki.

	İlaç	N	Ortalama	Standart sapma	P
GSH-Px (IU/gr prot)	Antagonist	16	17,30	2,43	,471
	Agonist	17	16,50	2,07	
GSH (µmol/gr prot)	Antagonist	16	3,67	1,70	,528
	Agonist	17	3,71	,92	
MDA (µmol/gr prot)	Antagonist	16	2,51	,47	,195
	Agonist	17	2,76	,45	
[Ca ²⁺] _i (nM/sn)	Antagonist	16	607734,09	425349,01	,666
	Agonist	17	573315,56	372663,94	

GSH-Px: Glutasyon peroksidaz aktivitesi; GSH: Glutasyon; MDA: Malondialdehit; [Ca²⁺]_i: Kalsiyum konsantrasyonu

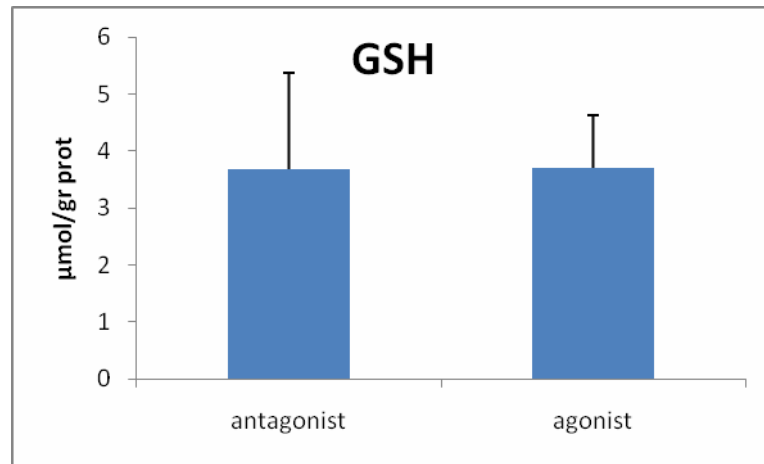
Çalışmamızda antagonist ilaç verilen 16 hastanın GSH-Px aktivitesi değerlerinin ortalamaları 17,3 IU/gr protein, agonist ilaç verilen 17 hastanın GSH-Px aktivitesi değerleri ortalamaları 16,50 IU/gr protein olarak bulunmuştur (Grafik 1). GSH-Px aktivitesi değerleri ortalamaları bakımından antagonist ve agonist ilaç verilen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır.



GSH-Px: Glutasyon peroksidaz aktivitesi

Grafik 1. Agonist ve antagonist ilaç verilen hastaların GSH-Px aktivitesi değerleri ortalamaları

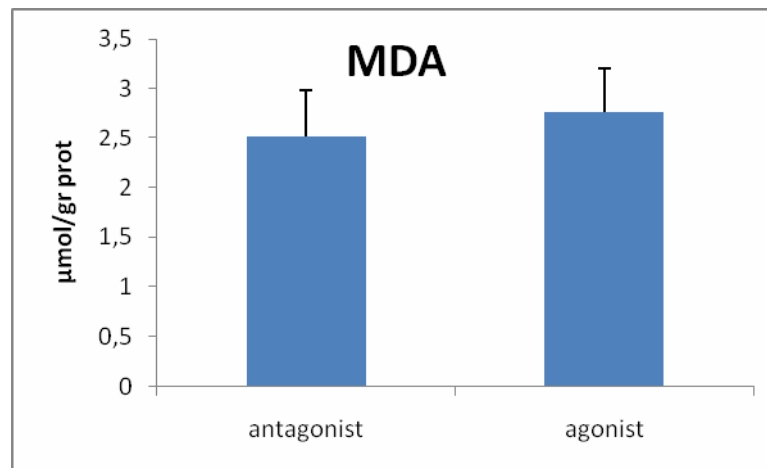
Çalışmamızda antagonist ilaç verilen 16 hastanın GSH değerleri ortalamaları 3,67 $\mu\text{mol/gr}$ protein, agonist ilaç verilen 17 hastanın GSH değerleri ortalamaları 3,71 $\mu\text{mol/gr}$ protein olarak bulunmuştur (Grafik 2). GSH değerleri ortalamaları bakımından antagonist ve agonist ilaç verilen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır.



GSH: Glutasyon

Grafik 2. Agonist ve antogonist ilaç verilen hastaların GSH değerleri ortalamaları

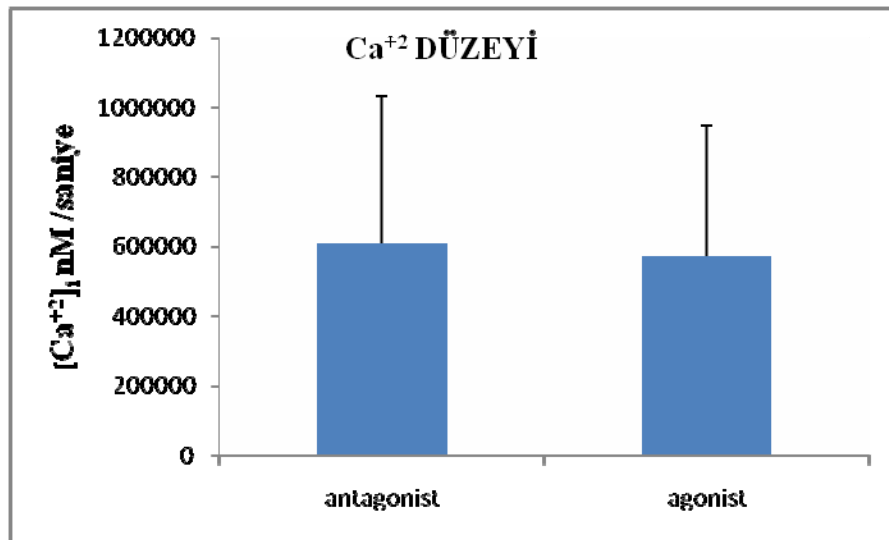
Çalışmamızda antagonist ilaç verilen 16 hastanın MDA değerleri ortalamaları 2,51 $\mu\text{mol/gr}$ protein, agonist ilaç verilen 17 hastanın MDA değerleri ortalamaları 2,76 $\mu\text{mol/gr}$ protein olarak bulunmuştur (Grafik 3). MDA değerleri ortalamaları bakımından antagonist ve agonist ilaç verilen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır.



MDA: Malondialdehit

Grafik 3. Agonist ve antogonist ilaç verilen hastaların MDA değerleri ortalamaları.

Çalışmamızda antagonist ilaç verilen 16 hastanın Ca^{+2} konsantrasyonları ortalamaları 607734,09 nM/sn, agonist ilaç verilen 17 hastanın Ca^{+2} konsantrasyonları ortalamaları 573315,56 nM/sn olarak bulunmuştur (Grafik 4). Ca^{+2} konsantrasyonları ortalamaları bakımından antagonist ve agonist ilaç verilen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır.



Ca²⁺: Kalsiyum

Grafik 4. Agonist ve antagonist ilaç verilen hastaların Ca^{+2} konsantrasyonları ortalamaları.

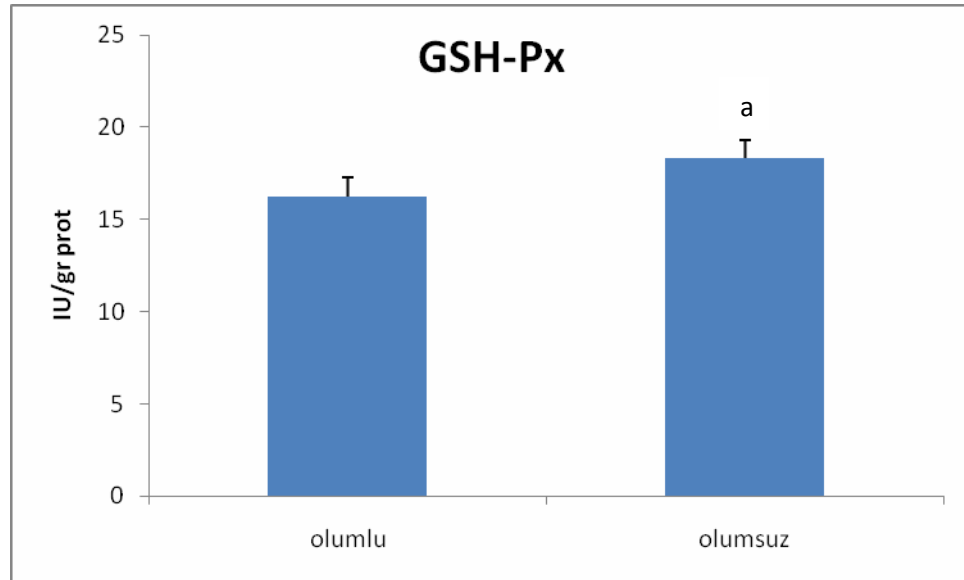
Tablo 6. Fertilizasyon ile Ca^{+2} ve antioksidanlar arasındaki ilişki.

	Fertilizasyon	N	Ortalama	Standart Sapma	p değeri
GSH-Px (IU/gr prot)	Olumlu	23	16,26	1,86	0,021
	Olumsuz	10	18,33	2,52	
GSH (μ mol/gr prot)	Olumlu	23	4,03	1,41	0,031
	Olumsuz	10	2,93	0,72	
MDA (μ mol/gr prot)	Olumlu	23	2,58	0,44	0,505
	Olumsuz	10	2,76	0,53	
[Ca ²⁺] _i (nM/sn)	Olumlu	23	813734,4	227150,3	0,000
	Olumsuz	10	75421,7	35408,7	

GSH-Px: Glutasyon peroksidaz; GSH: Glutasyon; MDA: Malondialdehit; [Ca²⁺]_i: Kalsiyum konsantrasyonu

Çalışmamızda fertilize olan oositlerin granuloza hücrelerindeki GSH-Px aktivitesi değerleri ortalamaları 16,26 IU/gr protein, fertilize olmayan oositlerin granuloza hücrelerindeki GSH-Px aktivite değerleri ortalamaları ise 18,33 IU/gr

protein olarak bulunmuştur (Grafik 5). Fertilize olmayan oositlerin granuloza hücrelerindeki GSH-Px aktivite değerleri ortalaması, fertilize olan oositlerin granuloza hücrelerinin GSH-Px aktivitesi değerleri ortalamasına göre istatistiksel açıdan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p=0,021$).



GSH-Px: Glutatyon peroksidaz aktivitesi

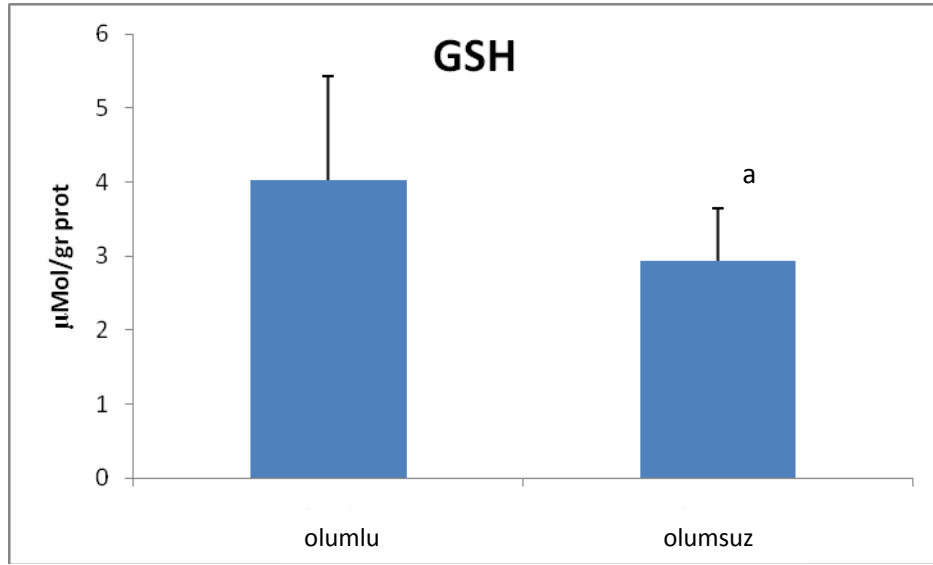
^a $p < 0,05$ Olumlu grubuna kıyasla

Grafik 5. GSH-Px aktivitesi değerleri ortalaması ile fertilizasyon arasındaki ilişki.

Çalışmamızda fertilize olan oositlerin granuloza hücrelerindeki GSH değerleri ortalamaları $4,03 \mu\text{mol/gr}$ protein, fertilize olmayan oositlerin granuloza hücrelerindeki GSH değerleri ortalamaları ise $2,93 \mu\text{mol/gr}$ protein olarak bulunmuştur (Grafik 6). Fertilize olan oositlerin granuloza hücrelerindeki GSH düzeyi, fertilize olmayan oositlerin granuloza hücrelerinin GSH değerleri ortalamalarına göre istatistiksel açıdan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p=0,031$).

olumlu

olumsuz

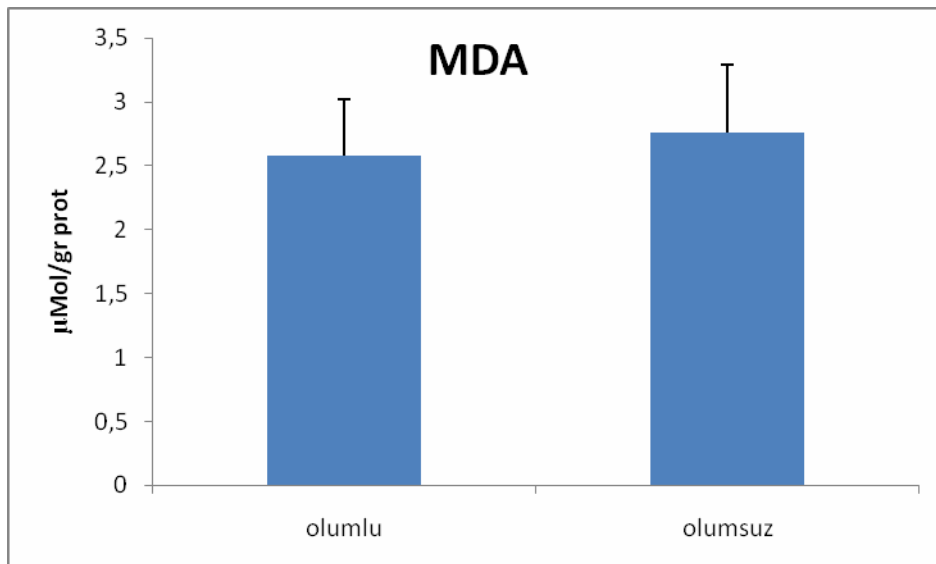


GSH: Glutasyon

^a p< 0,05 Olumlu grubuna kıyasla

Grafik 6. GSH değerleri ortalaması ile fertilizasyon arasındaki ilişki.

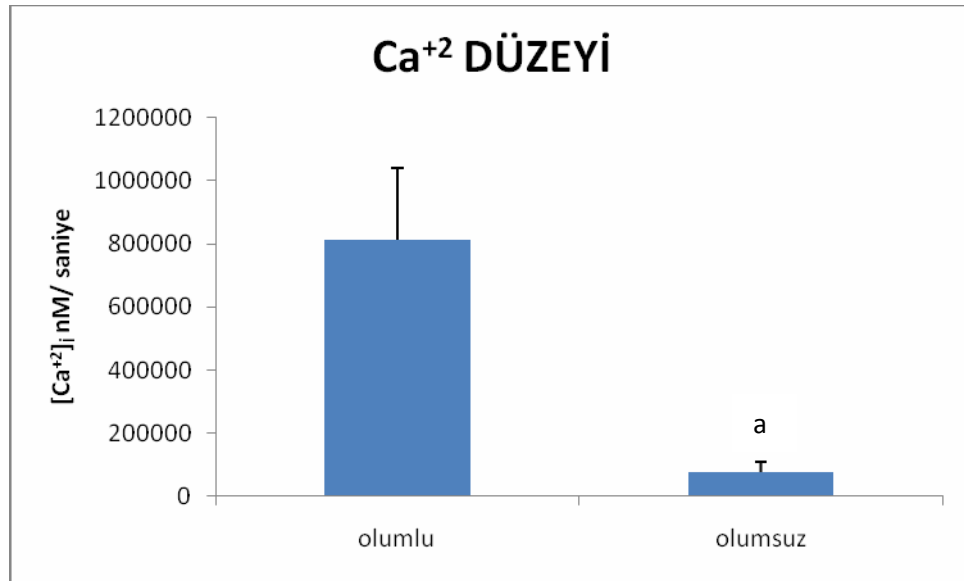
Çalışmamızda fertilize olan oositlerin granuloza hücrelerindeki MDA değerleri ortalamaları 2,58 µmol/gr protein, fertilize olmayan oositlerin granuloza hücrelerindeki MDA değerleri ortalamaları ise 2,76 µmol/gr protein olarak bulunmuştur (Grafik 7). Fertilize olan oositlerin granuloza hücrelerindeki MDA değerleri ortalaması ile fertilize olmayan oositlerin granuloza hücrelerinin MDA değerleri ortalaması arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.



MDA: Malondialdehit

Grafik 7. MDA değerleri ortalaması ile fertilizasyon arasındaki ilişki.

Çalışmamızda fertilize olan oositlerin granuloza hücrelerindeki Ca^{+2} konsantrasyonları ortalamaları 813734,4 nM/sn, fertilize olmayan oositlerin granuloza hücrelerindeki Ca^{+2} konsantrasyonları ortalamaları ise 75421,7 nM/sn olarak bulunmuştur (Grafik 8). Fertilize olan oositlerin granuloza hücrelerindeki Ca^{+2} düzeyi, fertilize olmayan oositlerin granuloza hücrelerinin Ca^{+2} konsantrasyonları ortalamalarından istatistiksel açıdan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p=0,0001$).



Ca²⁺: Kalsiyum

^a $p < 0,0001$ Olumlu grubuna kıyasla

Grafik 8. Ca²⁺ konsantrasyon ortalaması ile fertilizasyon arasındaki ilişki.

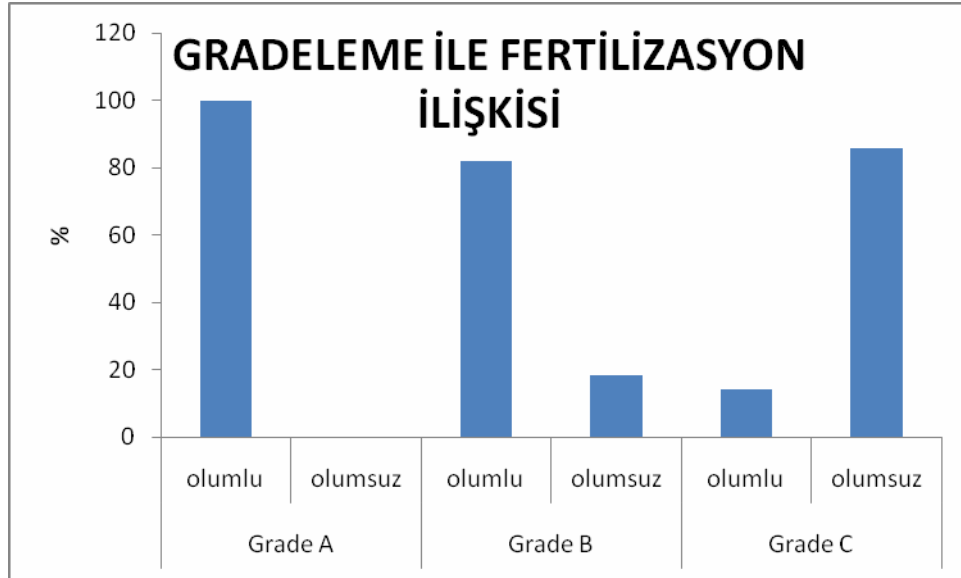
Tablo 7. Grade ile fertilizasyon ilişkisi

			Fertilizasyon		Total
			Olumsuz	Olumlu	
Grade A	N		0	4	4
	%		0	100	100
Grade B	N		4	18	22
	%		18,2	81,8	100
Grade C	N		6	1	7
	%		85,7	14,3	100
Total	N		10	23	33
	%		30,3	69,7	100

Grade A: Oosit skorlamasında 4 puan alan oositler, Grade B: Oosit skorlamasında 2-3 puan alan oositler, Grade C: Oosit skorlamasında 1 puan alan oositler

Grade A oositler %100 fertilize olmuştur. Grade B oositlerde fertilizasyon oranı %81,8, grade C oositlerde ise fertilizasyon oranı %14,3 olarak bulunmuştur (Grafik 9). Sonuç olarak grade ile fertilizasyon oranı arasında istatistiksel olarak

anamlı bir iliŒki vardır ve grade iyileŒtikçe fertilizasyon oranı artmaktadır. Grade A ve B oositlerde fertilize olma oranında daha yüksek bir anlamlılık görünmektedir ($p=0.001$).



Grade A: Oosit skorlamasında 4 puan alan oositler, Grade B: Oosit skorlamasında 2-3 puan alan oositler, Grade C: Oosit skorlamasında 4 puan alan oositler

Grafik 9. Oosit grade ile fertilizasyon arasındaki iliŒki.

Tablo 8. Grade B ve grade C oositlerde fertilizasyon oranının karŒılaŒtırması.

			Fertilizasyon		Total
			Olumsuz	Olumlu	Olumsuz
Grade B	N	4	18	22	
	%	18,2	81,8	100	
Grade C	N	6	1	7	
	%	85,7	14,3	100	
Toplam	N	10	19	29	
	%	34,5	65,5	100	

Grade B: Oosit skorlamasında 2-3 puan alan oositler, Grade C: Oosit skorlamasında 4 puan alan oositler

Grade B oositlerde grade C oositlere göre fertilizasyon oranı istatistiksel açıdan anlamlı olarak yüksek bulunmuŒtur ($p=0,003$).

Tablo 9. Grade A ve grade C oositlerde fertilizasyon oranının karşılaştırması.

			Fertilizasyon		Total
			Olumsuz	Olumlu	Olumsuz
Grade A	N		0	4	4
	%		0	100	100
Grade C	N		6	1	7
	%		85,7	14,3	100
Total	N		6	5	11
	%		54,5	45,5	100

Grade A: Oosit skorlamasında 4 puan alan oositler, Grade C: Oosit skorlamasında 4 puan alan oositler

Grade A oositlerde grade C oositlere göre fertilizasyon oranı istatistiksel açıdan anlamlı olarak daha anlamlı bulunmuştur ($p=0.015$).

Tablo 10. Grade A ve grade B oositlerde fertilizasyon oranının karşılaştırması.

			Fertilizasyon		Total
			Olumsuz	Olumlu	Olumsuz
Grade A	N		0	4	4
	%		0	100	100
Grade B	N		4	18	22
	%		18,2	81,8	100
Total	N		4	22	26
	%		15,4	84,6	100

Grade A: Oosit skorlamasında 4 puan alan oositler, Grade B: Oosit skorlamasında 2-3 puan alan oositler

Grade A ve grade B oositlerde fertilizasyon oranı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmemiştir.

Tablo 11. Oosit gradelerine göre GSH-Px aktivitesi, GSH, MDA ve Ca²⁺ değerleri ortalamalarının ilişkisi.

Değişken	Oosit grade	N	Ortalama	Standart Sapma	Min	Maks	P değerleri
GSH-Px (IU/gr prot)	Grade A	4	16,51	2,09	14,35	19,28	0,887*
	Grade B	22	16,738	2,456	12,098	22,025	0,345**
	Grade C	7	17,613	1,774	15,066	20,074	0,241***
GSH (μmol/gr prot)	Grade A	4	3,182	0,260	2,916	3,521	0,394*
	Grade B	22	3,904	1,588	1,974	7,268	0,450**
	Grade C	7	3,349	0,438	2,657	3,904	0,541***
MDA (μmol/gr prot)	Grade A	4	2,7288	0,1188	2,5824	2,8360	0,722*
	Grade B	22	2,635	0,534	1,593	3,913	1,000**
	Grade C	7	2,616	0,431	2,120	3,086	1,000***
[Ca ⁺²] _i (nm/sn)	Grade A	4	854345	109933	763044	1012455	0,570*
	Grade B	22	686189	367668	54485	1172445	0,008**
	Grade C	7	136652	157518	23371	481688	0,004***

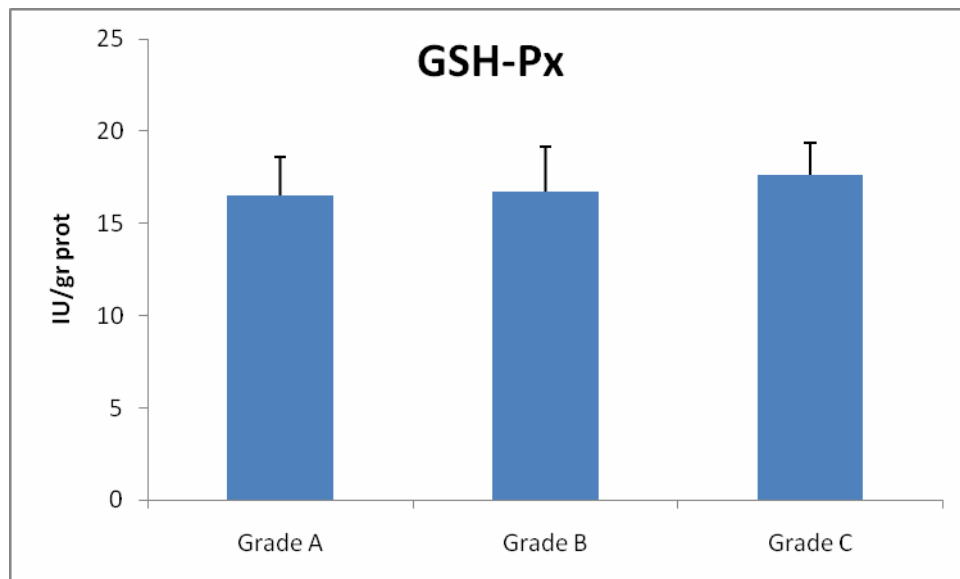
GSH-Px: Glutasyon peroksidaz aktivitesi; GSH: Glutasyon; MDA: Malondialdehit; [Ca⁺²]_i: Kalsiyum konsantrasyonu, Grade A: Oosit skorlamasında 4 puan alan oositler, Grade B: Oosit skorlamasında 2-3 puan alan oositler, Grade C: Oosit skorlamasında 4 puan alan oositler

* Grade A ve Grade B karşılaştırmaları

**Grade A ve Grade C karşılaştırmaları

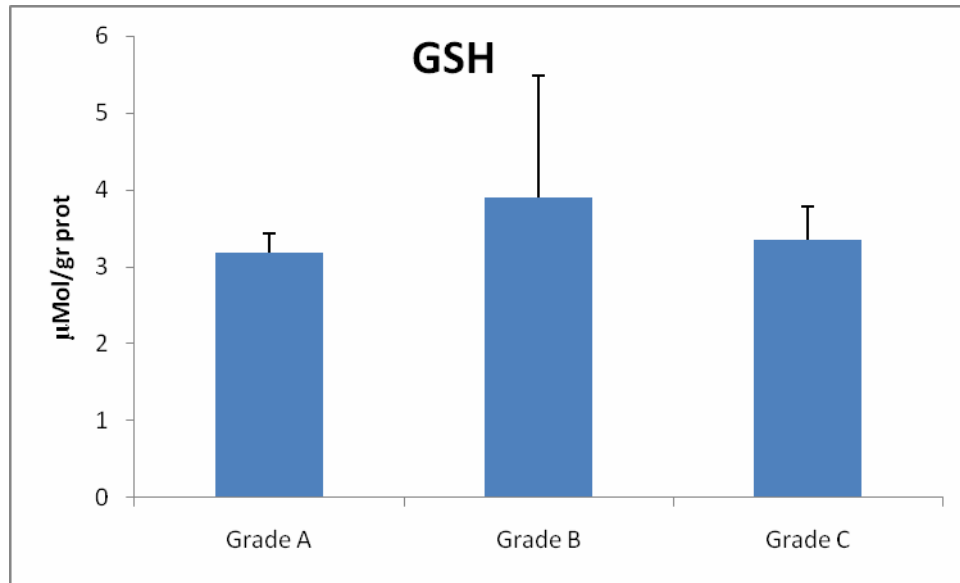
*** Grade B ve Grade C karşılaştırmaları

GSH-Px aktivitesi, GSH, MDA düzeylerinin ortalamaları ile oosit gradelemesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (Grafik 10, 11, 12).



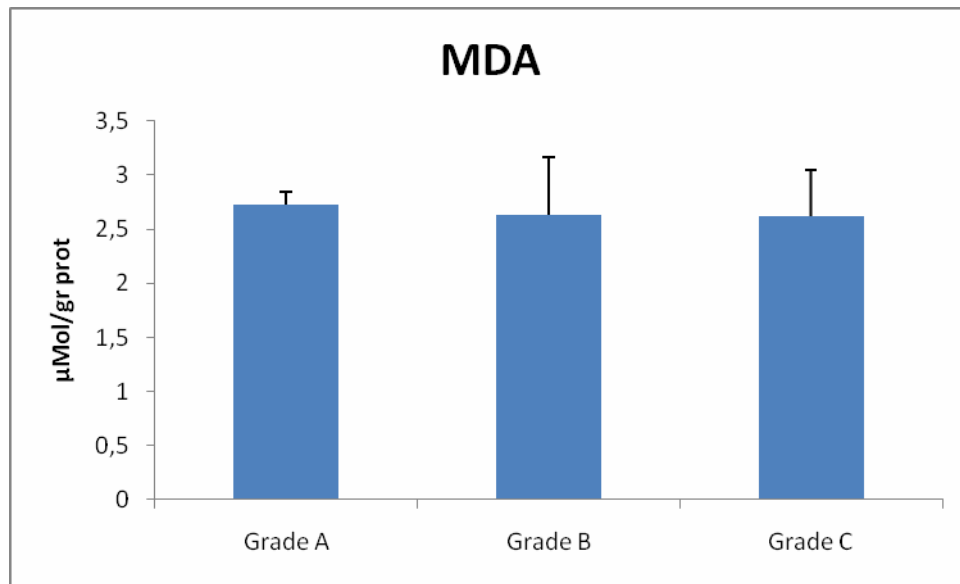
GSH-Px: Glutasyon peroksidaz, Grade A: Oosit skorlamasında 4 puan alan oositler, Grade B: Oosit skorlamasında 2-3 puan alan oositler, Grade C: Oosit skorlamasında 4 puan alan oositler

Grafik 10. GSH-Px ortalamaları ile oosit gradeleri arasındaki ilişki.



GSH: Glutatyon, Grade A: Oosit skorlamasında 4 puan alan oositler, Grade B: Oosit skorlamasında 2-3 puan alan oositler, Grade C: Oosit skorlamasında 4 puan alan oositler

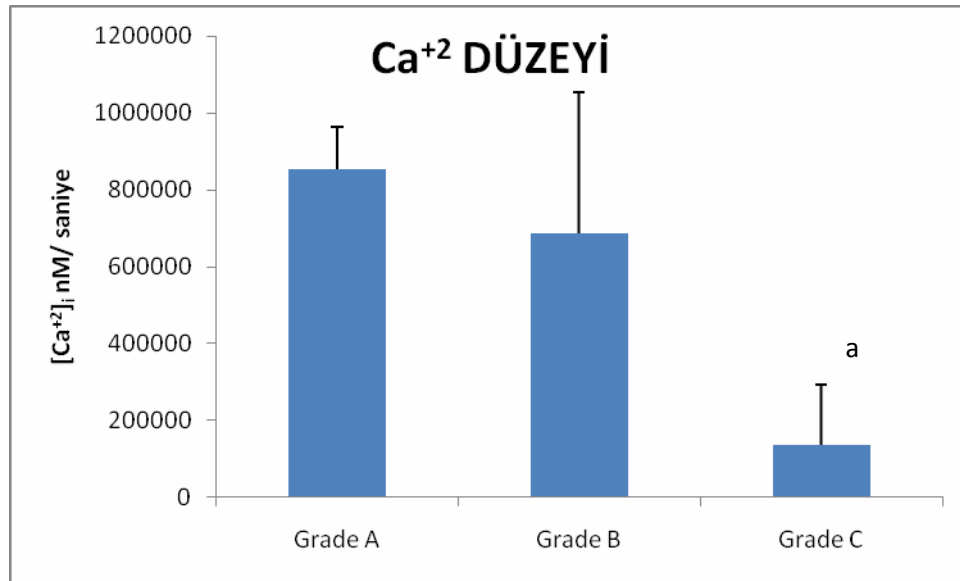
Grafik 11. GSH düzeyleri ile oosit gradeleri arasındaki ilişki.



MDA: Malondialdehit, Grade A: Oosit skorlamasında 4 puan alan oositler, Grade B: Oosit skorlamasında 2-3 puan alan oositler, Grade C: Oosit skorlamasında 4 puan alan oositler

Grafik 12. MDA ortalamaları ile oosit gradeleri arasındaki ilişki.

Grade A oositlerin granuloza hücrelerindeki Ca^{+2} konsantrasyonları ortalamaları grade C oositlerden istatistiksel açıdan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (Grafik 13).



[Ca²⁺]_i: Kalsiyum konsantrasyonu , Grade A: Oosit skorlamasında 4 puan alan oositler, Grade B: Oosit skorlamasında 2-3 puan alan oositler, Grade C: Oosit skorlamasında 4 puan alan oositler

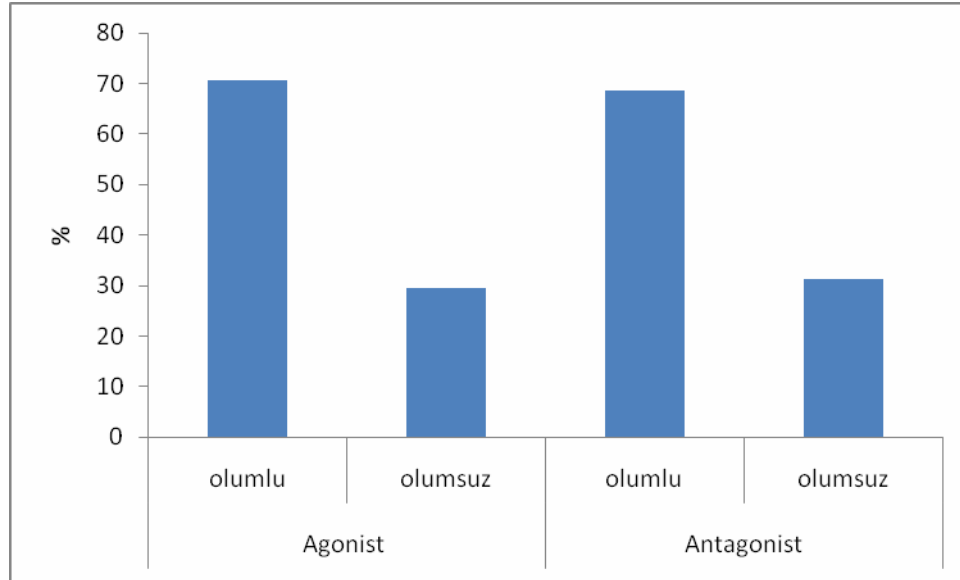
^a p<0.005 Grade A ve grade B grublarına kıyasla

Grafik 13. Ca²⁺ düzeyi ile oosit gradeleri arasındaki ilişki.

Tablo 12. Uygulanan ilaç protokolü ile fertilizasyon sonuçları arasındaki ilişki.

		Fertilizasyon		Toplam
		Olumsuz	olumlu	
Agonist	N	5	12	17
	%	29,4	70,6	100
Antagonist	N	5	11	16
	%	31,3	68,7	100,0
Total	N	10	23	33
	%	30,3	69,7	100

Çalışmamızda agonist ilaç verilen 17 hastanın %70,6'ında fertilizasyon olmuş, antagonist ilaç verilen 16 hastanın %69,7'inde fertilizasyon olmuştur. Verilen ilaç protokolü ile fertilizasyon arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (Grafik 15).



Grafik 14. Uygulanan ilaç protokolu ile fertilizasyon arasındaki ilişki.

Tablo 13. Yapılan gradelemenin doğruluk derecesi.

Gruplar	Grade A	Grade B	Grade C
Grade A	4	5	0
Grade B	0	13	0
Grade C	0	4	7
N	4	22	7
Total doğruluk	4	13	7
Oran	1,00	0,59	1,00

n :33 total doğruluk :24 tahmin gücü :%73

Grade A: Oosit skorlamasında 4 puan alan oositler, Grade B: Oosit skorlamasında 2-3 puan alan oositler, Grade C: Oosit skorlamasında 4 puan alan oositler

Yapılan diskriminant analizi sonucunda oluşturulan doğrusal ayırma fonksiyonu kullanılarak yapılan tahminler %73 doğru olarak yapılmıştır. Oosit grupları ayrı ayrı irdelendiğinde grade A ve grade C olan oositler %100 olarak ve yine kendi gruplarına doğru olarak tahmin edilmiştir. Grade B’de ise toplam 22 oositin 13 tanesi yani %59 u doğru tahmin edilmiştir.

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda infertil hastalardan elde edilen granuloza hücrelerindeki antioksidan parametlerden GSH-Px aktivitesi, GSH, lipit peroksidasyon (MDA) ve intrasellüler Ca^{+2} düzeylerini araştırarak elde ettiğimiz verilerin, oosit kalitesi ve fertilizasyon oranlarına etkisini, sonrasında da elde ettiğimiz sonuçlarla granuloza hücrelerindeki Ca^{+2} seviyeleri ve antioksidan düzeylerin fertilizasyon için prediktör olup olmadığını değerlendirmeyi amaçladık. Daha önce granuloza hücrelerindeki oksidatif stres ile oosit kalitesi ve fertilizasyon oranları arasında korelasyon olup olmadığını araştıran çalışmalar yapılmış olmasına rağmen, granuloza hücrelerinde intrasellüler Ca^{+2} düzeyleri ve antioksidan parametreler ile oosit kalitesi ve fertilizasyon oranı sonuçlarını kombine olarak ele alan herhangi bir çalışma yoktur.

Korunmasız cinsel ilişkiye rağmen bir yıl boyunca gebe kalınmaması olarak tanımlanan infertilitenin temelinde, gerek erkek gerekse bayan bireye bağlı birçok anatomik, fizyolojik bozukluklar ve oksidatif stres gibi etmenler yer almaktadır (66). Halk sağlığı açısından ciddi problem arz eden infertilitenin tanı ve tedavisi de hem masraflı hem de stresli bir durum olarak karşımıza çıkmaktadır. İnfertilite tedavisinde yardımcı üreme tekniklerinden faydalanılmaktadır. Bu yöntemlerden günümüzde en çok kullanılanı ICSI prosedürüdür. Bu yöntemde; belli boyuta kadar geliştirilen folikül alınarak oosit stoplazmasına tek bir sperm enjekte edilir. Dolayısıyla yöntemin başarısında oosit kalitesi, sperm motilite ve morfolojisi kilit rol oynar.

Her siklusta gelişmeye başlayan yaklaşık 5-10 tane folikülden bir tanesi ovulasyon aşamasına gelir. Folikülogenezi tamamlamada oosit kadar granuloza hücrelerinin de rolü büyüktür. Folikülogenez, hem endokrin sistem hem de oositin etrafındaki granuloza hücreleri ile olan parakrin etkileşimler tarafından düzenlenmektedir. Granuloza hücreleri, oosit büyüme-gelişme ve maturasyonu üzerinde önemli etkileri bulunan hücrelerdir. Oositleri çevreleyen granuloza hücreleri ile oositler arasındaki parakrin etkileşimler, hücre fonksiyonların ve bu koordinasyonun devamı açısından önem arz etmektedir. Granuloza hücrelerinin temel görevlerinden bir tanesi antioksidan maddeleri üreterek oositi serbest

radikallerin etkilerinden korumaktır. Böylece oosit oksidatif hasardan korunmuş olacak, ayrıca kalite ve fertilizasyon kabiliyetinde artma meydana gelecektir.

Normal fizyolojik şartlar altında hücrel reaksiyonlar sonucunda oluşan ve ağırlıklı olarak yaşamın temeli O_2 molekülünden türeyen serbest radikaller, reaktif oksijen türleri (ROT) olarak adlandırılmaktadır. ROT'lara başlıca örnekler, süperoksit radikali, hidroksil radikali ve hidrojen peroksittir. Vücutta en çok üretilen ROT, süperoksit radikalidir. En zararlı olan ise hidroksil radikalidir. H_2O_2 , serbest radikallerin endojen kaynağıdır ve hücrel düzeyde oksidatif strese neden olur (39). ROT'lar birçok antioksidan tamponlama mekanizması tarafından etkisiz hale getirilebilmekte ve ROT'lar ile tamponlama mekanizmaları arasındaki denge durumunun oksidan ajanlar lehine bozulması oksidatif stres olarak adlandırılmaktadır. Oksidatif stres (OS) lipitler, nükleik asitler, karbonhidratlar ve proteinlerin yapısında yapısal ve fonksiyonel değişiklikler meydana getirmekte ve hücrenin apoptotik yolağını tetiklemektedir (67). Oksidatif stres lipitlerde peroksidasyona neden olarak lipid peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Lipid peroksidasyon ürünleri mutajen, karsinojen ve genotoksiktir. Lipid peroksidasyonu sonucu açığa çıkan başlıca ürün malondialdehit (MDA)'dir. ROT'lara karşı vücutta olan başlıca antioksidan sistemler ise GSH, GSH-Px, SOD enzimleridir. CuZn-SOD; germinal vezikül ve metafaz 2 basamaklarında bulunur. GSH-Px ve Mn-SOD sadece metafaz 2 aşamasında bulunur. Bunların olması savunma mekanizmalarının oosit maturasyonunda önemli olduğunu gösterir. Oksidatif stresin oosit maturasyonunda ve ovulasyonda önemli fizyolojik rolü vardır. ROS'ların fazla üretimi kötü oosit kalitesi ile ilişkili olabilir. GSH-Px enziminin yapısına ko-faktör olarak selenyum girmektedir. GSH-Px enziminin sentezlenmesinde GSH substrat olarak kullanılmaktadır (68).

Çalışmamızı fertilizasyon sonucuna göre olumlu ya da olumsuz olmak üzere iki ana başlık altında topladık. Antioksidan analizler sonucunda olumsuz gruptaki oositlerin granuloza hücrelerinde GSH-Px aktivitesi değerleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde ($p<0,05$) yüksek bulunmuştur. GSH değerleri ise fertilize olan oositlerin granuloza hücrelerinde anlamlı olarak yüksek ($p<0,05$) bulunmuştur. Lipit peroksidasyonu göstergesi olan MDA düzeylerinde ise 2 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını gözlemledik. Oosit kalitesi ile granuloza

hücrelerindeki GSH-Px aktivitesi, GSH ve MDA düzeyleri arasındaki ilişkiye bakıldığında ise oosit kalitesi ile bu parametreler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir. Fertilize olan oositlerdeki GSH düzeyi, bu oositleri oksidatif stresin etkilerinden koruduğu için yüksek çıkmış olabilir. Paradoks olarak çalışmamızda fertilize olmayan gruptaki granuloza hücrelerinde GSH-Px aktivitesi yüksek bulunmuştur. GSH, GSH-Px enziminin substratı olmasının yanı sıra birçok fizyolojik görevlerde faydası mevcuttur. Antioksidan lipoik asitin etkisini gerçekleştirebilmesi için GSH'a ihtiyaç vardır. Ayrıca, birçok hücrel sistein gruplarında GSH önemli rol oynar. Fertilizasyon üzerinde de olumlu etkileri mevcuttur. Örneğin, yakın zamanlarda yapılan bir çalışmada (69), oositlerin olgunlaşmasında in vitro GSH uygulanmasının olumlu etkileri rapor edilmiştir. Serbest radikallerin göstergesi arasında MDA önemli bir yer tutmasına rağmen, nitrik oksit ve 8-OHdG gibi oksidasyon ürünleri hakkında bilgi verememektedir. Çalışmamızın eksikliklerinden bir tanesi, oksidasyon göstergesi olarak granuloza hücrelerinde sadece MDA düzeylerinin ölçülmüş olması ve diğer oksidatif ürünlerle ilgili sonuçların olmamasıdır. Bu çalışmada, MDA dışındaki oksidanların artışına bağlı olarak, GSH-Px aktivite düzeyleri azalmış olabilir.

Artan oksidatif hasar ile birlikte, oosit kalitesinde azalma, fertilizasyon oranlarında azalma, gebelik sürelerinde kısalma, gebelik komplikasyonlarında artma (preeklampsia vb.), aşırı kilo alımı gibi birçok komplikasyon gözlemlendiği bilinmektedir. Granuloza hücreleri ve foliküler sıvıda antioksidan parametrelerin fertilizasyon ve oosit kalitesi ile ilişkisini araştıran pek çok çalışma yapılmıştır. Granuloza hücrelerinin antioksidan kapasitesinin İVF başarısında önemli rol aldığı bildirilmiştir. Tamura ve ark. (70). yaptığı bir çalışmada; bir önceki gebe kalınamayan İVF siklusunda dejenere oosit sayısı %30'dan fazla olan kadınlarda ya da %50'den az fertilizasyon oranı gösteren kadınlarda intrafoliküler DNA hasarlarının sensitif bir indikatörü ve oksidatif stresin göstergesi olan 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) düzeylerinin ve lipid peroksidasyonunun başlangıcında oluşan bir ürün olan HEL'i anlamlı olarak yüksek bulmuşlardır. Ayrıca melatonin ve α -tokoferol ilavesi ile bu düzeylerin normalleşebileceğini bildirmişlerdir. Yine aynı çalışmada, melatonin ile 8-OHdG ve HEL düzeyleri arasında negatif korelasyon saptanmıştır. Melatonin verilmesiyle 8-OHdG ve HEL düzeyleri anlamlı olarak

azalmıştır ($p<0,05$). Aynı çalışmada oositlerin H_2O_2 ile 12 saat inkübe edilmesinden sonra 1. polar cisim anlamlı olarak azalmış ve H_2O_2 'nin inhibitör etkisi melatoninle geri dönmüştür. Sonuç olarak oksidatif stresin oosit maturasyonunu kötü etkilediğini ve melatoninin oksidatif hasardan oositi koruduğunu bulmuşlardır. Melatonin ile oosit kalitesi ve fertilizasyon oranları artmaktadır. Yang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da (71), fragmente embriyolar ile nonfragmente embriyolar ile kıyaslandığında fragmente embriyolarda H_2O_2 ve oksidan düzeyinin yüksek olduğu bulunmuştur. Paszkowski ve arkadaşlarının bir çalışmasında (72), antioksidanların artmış tüketiminin, ki bu da ROT düzeyinin artmasını gösterir, kötü oosit kalitesini gösterdiği bulunmuştur. Düşük kaliteli oosite sahip bireylerin antioksidan maddeler açısından zengin diyetler ile beslenmeleri veya tablet formlarını almaları sonucunda hem fertilizasyon hemde İVF başarılarında artış gözlemlenebilir. Antioksidan elementlerden; selenyum ve melatonin gibi maddelerin canlılara verilmesi ile GSH ve GSH-Px aktivitesi düzeylerinin arttığı gözlenmiştir (73). E vitamini takviyeli diyetle beslenen bireylerde yapılan çalışmalarda idrardaki peroksidasyon ürünlerinin azaldığı bildirilmiştir (74). Antioksidan elementler bakımından zengin meyve diyetiyle beslenen bayanlarda da oksidatif stres parametrelerinin kontrol grubuna nazaran daha düşük olduğu bildirilmiştir (75, 76). Mesela antioksidan bir element olan C vitamininin hem hemodilüsyona uğraması hem de fetusa aktif olarak transfer edilmesinden dolayı gebelik süresince ihtiyacı artan bir maddedir (77).

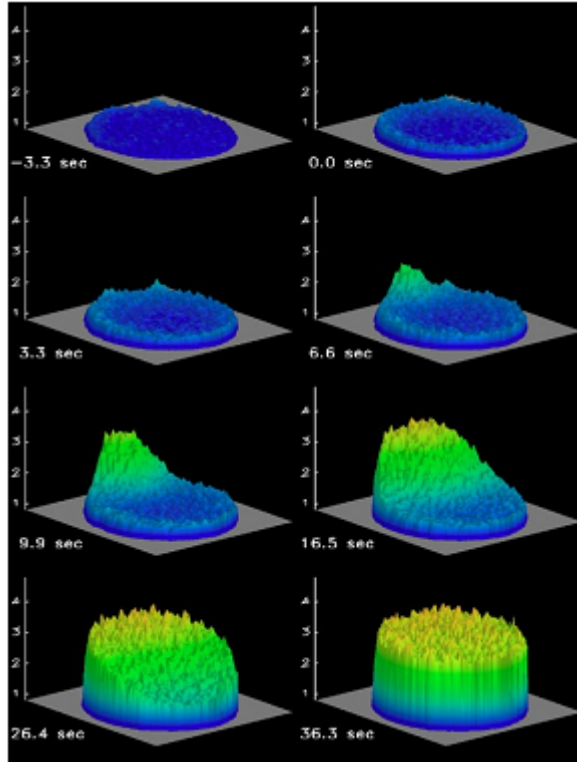
Örneğin granuloza hücrelerindeki geliştirilmiş reaktif oksijen türleri üretimi (2) düşük oosit fertilizasyon kabiliyeti, düşük embriyo kalitesi ve azalmış implantasyon oranları ile ilişkili bulunmuştur. Açıklanamayan infertilitede foliküler sıvıda GSH-Px aktivitesinde azalma söz konusudur (78). Matos ve ark. (2009) yaptıkları çalışmada granuloza hücrelerinde ZnSOD ve CuSOD düzeylerine bakarak fertilizasyon başarısını tayin etmeyi öngörmüşlerdir. ROT'ların seviyelerinin daha fazla tamponlanabildiği grade B ve grade C oosite sahip bireylerde embriyo oluşumunun, oksidan ajanların tamponlanamadığı bireylerdekilere nazaran istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı bildirilmiştir (79, 80). Yapılan hayvan deneylerinde, mevsimsel olarak menstrual siklus gösteren hayvanlarda, kısa süren sikluslarda melatonin gibi antioksidan bir elementin ve metabolitlerinin direkt etki ile serbest radikalleri etkisiz hale getirdiği gözlemlenmiştir (81, 82). Kötü oosit kalitesi kadın

infertilitesinin temel problemlerinden biridir. ROT'lar ovulatuvar süreç boyunca follikülde üretilir. Oksidatif stres kötü oosit kalitesinin bir nedeni olabilir.

Sitozolde Ca^{+2} düzeyi azalırsa, mitokondrinin depolarizasyonu azalmakta ve serbest radikal oluşumu da azaltmaktadır (83). Bu çalışmamızda, bu görüşü destekler nitelikte, olumsuz hastalarda sitozolik Ca^{+2} miktarı azalırken, antioksidan özelliğe sahip GSH-Px aktivitesi önemli düzeyde arttığı gözlemlendi.

Hücrel birçok işlevin yerine getirilmesinde iyonlar temel olarak görev almaktadır. Bu iyonlardan Ca^{+2} iyonu hücreler arası haberleşmenin yanı sıra, transkripsiyon, hücre zarı potansiyelinin oluşumu ve devam ettirilmesi, kasların kasılması, fizyolojik hücre ölümü (apoptozis) vb. birçok hücrel mekanizmada anahtar rol oynamaktadır. Hücre dışındaki Ca^{+2} iyon konsantrasyonu hücre içine oranla yaklaşık olarak 20.000 misli daha fazla olması bu iyon için ayrı bir özellik olarak belirginleşmektedir (84). Hücre içerisinde çok kısa sürelerde değişen bu hassas denge hücre içi Ca^{+2} ($[Ca^{+2}]_i$) sinyalini oluşturmaktadır. Çalışmamızın hedeflerinden bir tanesi de kliğimize infertilite şikayeti ile gelen bireylerden elde ettiğimiz granuloza hücrelerinden sitozole Ca^{+2} salınımını gruplar arasında kıyaslamak, bu evrensel iyonun İVF ve oksidatif hasardaki önemi belirlemektir. $[Ca^{+2}]_i$ salınımını kıyaslayabilmek için granuloza hücreleri floresan boyar madde ile boyandıktan sonra spektrofloreometre cihazındaki haznesine yerleştirildi ve hücrelerin ortama adaptasyonundan sonra (yaklaşık 40 sn sonra) $100 \mu M H_2O_2$ ile uyarıldılar. Bu aşamada H_2O_2 kullanmamızın nedeni, oksidatif stres oluşturmak değil, sadece hücre zarında bulunan iyon kanallarını aktive ederek hücre içi depolardan sitozole Ca^{+2} salınımını uyarmaktır. Daha sonra elde edilen veriler gruplar arasında karşılaştırılmıştır. Çalışmamızda fertilize olan oositlerin granuloza hücrelerinde Ca^{+2} düzeyi fertilize olmayan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Yine oosit kalitesi arttıkça granuloza hücrelerindeki Ca^{+2} düzeyi de anlamlı olarak yüksek bulunmaktadır. Ca^{+2} iyonunun fertilizasyondaki önemi, oositlerin içerisinde sinyal yollarını uyarmak, hücre içi depolardan Ca^{+2} salınımını ve bunun neticesinde oositleri hücrelerini aktive etmelerinden kaynaklanmaktadır (95, 96). Yapılan çalışmalarda $[Ca^{+2}]_i$ salınım yolağını tetikleyen fosfotidil inositollerin aşırı miktarda arttığı saptanmıştır (85, 86) Erkek eşey hücresi olan spermin oosit ile ilk iletişiminden sonra çok kısa bir süre içerisinde (~2sn) hücre içi

depolardan, büyük oranla endoplazmik retikulumdan, Ca^{+2} (87, 88). IP3 veya RyR aracılığı ile Ca^{+2} salınımı gerçekleşmektedir. Bu reaksiyonları takiben $[Ca^{+2}]_i$ salınımı artmakta ve artan Ca^{+2} sayesinde CICR (Calcium Induced Calcium Release) kalsiyum ile aktive olan kalsiyum kanallarının aktivasyonu ile gerçekleşmekte ve daha da fazla miktarda Ca^{+2} iyonu depolardan serbest hale geçirilmektedir (89-91). Ca^{+2} tarafından tetiklenen ve kanalların açılması ile sonuçlanan işlemler dizisi ve iyonların difüzyonu (Ca^{+2} 'a komşuluk eden reseptörler) fertilizasyon süresinde Ca^{+2} 'un sinyal üretiminin temelinde yatan mekanizma olarak kabul edilmektedir. Yapılan moleküler çalışmalar bu bulguları desteklemektedir (92, 93).



Resim 1. Deniz kestanesi yumurta hücrelerinde fertilizasyon esnasında artan kalsiyum miktarı (94).

Hücre içinde hassas bir denge halinde bulunan Ca^{+2} miktarının aşırı derecede artmasının, hücrelerdeki apoptotik yolağı tetiklendiği günümüzde yaygın olarak bilinmektedir (95).

Fertilizasyonu gerçekleşmeyen oositlerde Ca^{+2} salınım mekanizmasında görevli, yeni bulunan iki farklı kalsiyum salınımı uyarıcısı bulunmuştur (96-100).

Bunlardan birincisi; ADP-ribozil siklazın yan ürünü olan siklik ADPR'dur. cADPR etkisini IP3'den bağımsız olarak Ca^{+2} salınımını RyR aracılığı ile yapmaktadır (98). Şuanki bilgilerimizle cADPR'nin özel bir reseptör olup olmadığı henüz bilinmemektedir. Ancak cADPR aktivasyon için kalmoduline ihtiyaç duymaktadır. Kalmodulin ise RyR'ye karşı kalsiyum ile aktive olan kalsiyum kanallarının sensitivitesini ve cADPR'ye affinitesini artırmaktadır (101). Yapılan çalışmalar bizim bulgularımızı destekler niteliktedir. Hücrede oksidatif stresin neden olduğu DNA hasarı sonucu, 3 değişik yolla ADPR sentezlendiği bilinmektedir (102). ADPR, TRPM2 (Transient reseptör potential katyon kanalı M2) kanallarını açarak sitozole Ca^{+2} akışını artırmakta ve böylece mitokondrinin depolarizasyon artışı ve mitokondrial porların açılması ile serbest radikallerin daha çok üretilmesi sağlanmakta (103), ADPR sentezi artmakta, TRPM2 katyon kanalları daha da açılmaktadır. Bu olaylar hücreleri apoptozise kadar götürmektedir. Normal şartlar altında bir hücrede hücre içindeki Ca^{+2} miktarı 80-100 nM civarındadır. Yukarıda da bahsettiğimiz gibi hücre içerisindeki Ca^{+2} konsantrasyonundaki uzun süreli artışlar, sinyal mekanizmasının oluşumundan sonra hücreyi ölüme götürmektedir. Ancak sinyal oluşumu sırasında da hücre içinde belirli miktarda Ca^{+2} bulunması gerekmektedir. Yapılan patch-clamp çalışmalarında bizim sonuçlarımızı destekler nitelikte bilgiler bildirilmiştir Steinhardt ve arkadaşları; ekinoderm yumurta hücrelerinde fertilizasyon esnasında depolarizasyon gözlemlediklerini bildirmişlerdir (104). 20 ms gibi çok kısa bir sürede gerçekleşen bu olayın (membran potansiyelinin yaklaşık 20 mV'a ulaşması) polispermi olayını engellemek için bir bariyer olabileceği düşünülmektedir (105, 106). Bu hızlı depolarizasyon süresinde voltaja duyarlı Ca^{+2} kanalı alt tiplerinden birisi olan L-tipi Ca^{+2} kanalları aktif olarak görev almaktadır. Çalışmamızın sonucunda; düşük düzeyde Ca^{+2} iyonuna sahip hücrelerde fertilizasyon işleminin başarılı olmadığını, ancak bu gruba kıyasla $[Ca^{+2}]_i$ miktarı daha da artmış gruptaki bireylerde İVF'in başarıya ulaştığı gözlemlenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar, İVF programına alınmış ve granuloza hücrelerinde düşük Ca^{+2} düzeylerine sahip bireylerde başarısız olduğunu, yüksek Ca^{+2} düzeyli grupta ise başarı oranının yükseldiğini göstermektedir. Bu durum canlı türlerinde değişiklik arz edebilmektedir. Mesela deniz kestanesi hücrelerinde yapılan çalışmalarda (94); sperm ve yumurta hücresinin birleşmesi ve bunu takiben fertilizasyon işleminin

gerçekleşmesi için sitoplazmik Ca^{+2} düzeylerinde herhangi bir artışa ihtiyaç duyulmadığı, aksine artan $[Ca^{+2}]_i$ seviyelerinin fertilizasyonu engelleyebileceği ihtimali düşünümüştür. Bu konu ile ilgili çalışmamızın ilk olması ayrı bir önem arz etmektedir. Bu konunun kesinleştirilebilmesi için ileri düzeyde çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Çalışmamızda baktığımız parametrelerden birisi de oosit kalitesi ile fertilizasyon arasında ilişkidir. Çalışmamızda oosit kalitesi arttıkça fertilizasyon oranları anlamlı olarak artmaktadır ($p=0,01$). Bu konu hakkında daha önce yapılan çalışmalardaki sonuçlar da aynı yöndedir. Wilding ve ark.(107) yaptıkları çalışmada oositleri ışık mikroskobunda baktıkları granularitenin özelliği, vakuol ya da inklüzyon içerip içermemeleri ve ICSI pipetine gösterdikleri dirence göre her parametreye 0 ile 3 arası puana vererek sınıflamışlardır. Oosit kalitesi arttıkça fertilizasyon oranlarının anlamlı olarak arttığını, kaliteli oositlerden kaliteli embriyolar oluştuğunu bulmuşlardır.

İn vitro fertilizasyon yöntemlerinde hangi yöntem kullanılacaksa kullanılsın hastalara kontrollü overyan hiperstimulasyon uygulanarak folikül boyutları belli boyuta ulaştırılır. Bunun için günümüzde en sık kullanılan ajanlar rekombinan FSH preparatlarıdır. Bu preparatlara siklus yönetimini tamamen kendi kontrolümüze almak için gonadotropin agonistleri ya da antagonistleri eklenerek 2 farklı protokol uygulanır. Çalışmamızda da bir kısım hastalara agonist protokol bir kısım hastalara antagonist protokol uyguladık. Verilen ilaç protokolu ile fertilizasyon oranları ve GSH-Px aktivitesi, GSH, MDA ve Ca^{+2} düzeyleri bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Bodri ve ark. yaptıkları çalışmada agonist ve antagonist protokol uygulanan hastalarda gebelik oranları arasında anlamlı fark bulamamışlardır. Sadece antagonist protokol verilen hastalarda stimülasyon süresi anlamlı olarak daha kısa sürmüştür (108).

Çalışmada, sonuç olarak oosit kalitesi üzerinde glutatyonun ve sitozolik Ca^{+2} miktarının önemli olduğunu gözlemledik. Bu nedenle, sitozolik Ca^{+2} düzenleyiciler ve glutatyonun in vivo ve in vitro şartlarda uygulanması faydalı olabilir. Ca^{+2} voltaja duyarlı ve transient reseptör potential (TRP) kanallarından hücre içerisine

girmektedir. İleride yapılacak çalışmalarda bu oositlerde Ca^{+2} hangi kanallardan girerek fertilizasyonu etkilediğinin araştırılması gereklidir.

ÖZET

İn Vitro Fertilizasyon Hastalarından Elde Edilen Granuloza Hücrelerindeki İntraselüler Kalsiyum Düzeyinin ve Oksidan Parametrelerin Oosit Kalitesine ve Fertilizasyon Oranlarına Etkisi

İnfertilite 1 yıl korunmasız cinsel ilişkiye rağmen gebe kalınamaması durumudur. İnfertilite etyolojisinin yaklaşık %30'unu oluşturan kadın faktörünün en önemli kısmı ovulatuvar bozukluklar ve tuboperitoneal faktörlerdir. Granuloza hücreleri oositle yakın temas halinde olan oositin büyüme, gelişme, maturasyonu ve fertilizasyonunda önemli olan hücrelerdir. Granuloza hücreleri oositi oksidatif stresin zararlı etkilerinden korurlar. Fertilizasyon başarısını tahmin etmede oositin kendisi ve granuloza hücrelerinin değerlendirilmesi önem taşır. Hücresel olaylar sonucu açığa çıkan serbest radikaller, antioksidan tamponlama sistemleri tarafından zararsız ürünlere dönüştürülmektedir. Bu durum organizmada her zaman bir denge içindedir. Bu dengenin oksidatif ajanlar lehine bozulması sonucu oksidatif stres meydana gelerek hücreler apoptozise gider. Ca^{+2} , hücresel olaylarda ikincil haberci olarak görev alan bir iyondur. Oosit maturasyonu ve fertilizasyonda Ca^{+2} 'in önemli görevleri vardır.

Bu çalışmanın amacı granuloza hücrelerinde GSH, MDA, $[Ca^{+2}]_i$ ve GSH-Px aktivitesi değerlerinin oosit kalitesi ve fertilizasyona etkisini araştırmaktır.

İn vitro fertilizasyon hastalarından kontrollü overyan hiperstimulasyon sonucu elde edilen foliküller oosit pick up işlemi ile toplanarak oositin etrafındaki granuloza hücreleri ayrıldı. Bu hücrelerdeki GSH, MDA, $[Ca^{+2}]_i$ ve GSH-Px aktivitesi değerlerine bakıldı. Granuloza hücreleri alınan oosit gradelendi ve fertilize olup olmadığı takip edildi. Oosit gradeleri ile fertilizasyon arasında, oosit gradeleri ile GSH, MDA, $[Ca^{+2}]_i$ ve GSH-Px aktivitesi değerleri arasında, fertilizasyon ile GSH, MDA, $[Ca^{+2}]_i$ ve GSH-Px aktivitesi değerleri arasında, verilen ilaç protokolü ile fertilizasyon arasında, verilen ilaç protokolü ile GSH, MDA, $[Ca^{+2}]_i$ ve GSH-Px aktivitesi değerleri arasında ilişki olup olmadığına bakıldı

Verilen ilaç protokolü ile fertilizasyon arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı. Oosit gradeleri ile fertilizasyon oranı arasında anlamlı bir ilişki saptandı ($p<0,05$). Oosit kalitesi iyileştikçe fertilizasyon oranında artma izlendi. Fertilize olan oositlerde Ca^{+2} ve GSH değerleri anlamlı olarak yüksek, GSH-Px aktivite değerleri ise fertilize olmayan oositlerde anlamlı olarak yüksek bulundu. MDA ile fertilizasyon arasındaki anlamlı bir farklılık saptanmadı. Oosit kalitesi arttıkça Ca^{+2} düzeylerinde de istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptandı.

Sonuç olarak çalışmamızda granuloza hücrelerindeki Ca^{+2} miktarının artması oosit kalitesi ve fertilizasyonu olumlu yönde etkilemektedir. GSH değeri yüksek olan oositlerde fertilizasyon oranı yüksek saptanmıştır. GSH-Px aktivite değeri ise fertilize olmayan oositlerde daha yüksek olarak bulundu.

Anahtar kelimeler: İn vitro fertilizasyon, granuloza hücreleri, oksidatif stres, Ca^{+2}

SUMMARY

The Effects of Intracellular Ca^{2+} and Oxidant Parameters On Fertilization Ratio and Oocyte Quality on Granulosa Cells Which Was Taken From in Vitro Fertilization Patients

Infertility is defined as the failure to conceive a recognized pregnancy after 1 year of unprotected intercourse. 30 % of infertility etiology is the female factor. The most important female factors are ovulatory disorders and tuboperitoneal factors. Granulosa cells are in close relationship with oocyte and they have important roles on oocyte development, maturation and fertilization. Granulosa cells protect the oocyte from the harmful effects of oxidative stress. Evaluation of the oocyte and granulosa cells are important for prediction of the fertilization success. Free radicals may occur in normal physiological conditions. They can be neutralized by antioxidant mechanisms. This situation is always under balance. If this balance changes against oxidative stress parameters -is called oxidative stress- the cells may go under apoptosis. Ca^{2+} is an universal cation which has important roles on fertilization and oocyte maturation.

The aim of this study is to investigate the effects of GSH, MDA, intracellular Ca^{2+} release and GSH-Px activity levels on fertilization and oocyte quality in granulosa cells.

After controlled ovarian hyperstimulation, the follicles were taken via oocyte pick up process from in vitro fertilization patients and granulosa cells were separated from oocyte. We evaluated the levels of GSH, MDA and intracellular Ca^{2+} release, GSH-Px activity in granulosa cells. We did a classification to the oocytes which were separated from granulosa cells and we observed the fertilization of these oocytes. We evaluated if there was a relationship between oocyte quality and fertilization ratio, oocyte quality and GSH, MDA, Ca^{2+} , GSH-Px activity levels, fertilization and GSH, MDA, Ca^{2+} , GSH-Px activity levels, drug protocol and fertilization.

There wasn't any statistically important difference between drug protocol and fertilization. We determined statistically significant importance between oocyte quality and fertilization ($p < 0,05$). When the oocyte quality was increased the fertilization ratio was also increased. The levels of GSH and Ca^{2+} were higher in the fertilized group than the unfertilized group and it was statistically important ($p < 0,05$). GSH-Px activity level was higher in the unfertilized group than the fertilized group. There was no statistically important difference between each group in MDA levels. We also determined that Ca^{2+} levels were higher when the oocyte quality was increased.

As a result of our study the increased amount of Ca^{2+} levels also increases oocyte quality and fertilization rate. If the GSH levels were higher then the fertilization ratio was higher. But GSH-Px activity levels were higher in the unfertilized group.

Key words: In vitro fertilization, granulosa cells, oxidative stress, Ca^{2+}

KAYNAKLAR

1. Seifried HE, Anderson DE, Fisher EI, Milner JA. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J Nutr Biochem*. 2007 Sep;18(9):567-79.
2. Jancar N, Kopitar AN, Ihan A, Virant Klun I, Bokal EV. Effect of apoptosis and reactive oxygen species production in human granulosa cells on oocyte fertilization and blastocyst development. *J Assist Reprod Genet*. 2007 Feb-Mar;24(2-3):91-7.
3. Bates GW, Garza DE, Garza MM. Clinical manifestations of hormonal changes in the menstrual cycle. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 1990 Jun;17(2):299-310.
4. Corson SL. Evaluation of the subfertile couple: the fine points. *Int J Fertil Womens Med*. 2001 Nov-Dec;46(6):309-14.
5. Miller PB, Soules MR. The usefulness of a urinary LH kit for ovulation prediction during menstrual cycles of normal women. *Obstet Gynecol*. 1996 Jan;87(1):13-7.
6. Luciano AA, Peluso J, Koch EI, Maier D, Kuslis S, Davison E. Temporal relationship and reliability of the clinical, hormonal, and ultrasonographic indices of ovulation in infertile women. *Obstet Gynecol*. 1990 Mar;75(3 Pt 1):412-6.
7. Haney AF. Endometrial biopsy: a test whose time has come and gone. *Fertil Steril*. 2004 Nov;82(5):1295-6; discussion 301-2.
8. Gindoff PR, Jewelewicz R. Reproductive potential in the older woman. *Fertil Steril*. 1986 Dec;46(6):989-1001.
9. Chuang CC, Chen CD, Chao KH, Chen SU, Ho HN, Yang YS. Age is a better predictor of pregnancy potential than basal follicle-stimulating hormone levels in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2003 Jan;79(1):63-8.
10. Evers JL, Slaats P, Land JA, Dumoulin JC, Dunselman GA. Elevated levels of basal estradiol-17beta predict poor response in patients with normal basal levels of follicle-stimulating hormone undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 1998 Jun;69(6):1010-4.
11. Ashrafi M, Madani T, Tehranian AS, Malekzadeh F. Follicle stimulating hormone as a predictor of ovarian response in women undergoing controlled ovarian hyperstimulation for IVF. *Int J Gynaecol Obstet*. 2005 Oct;91(1):53-7.
12. Seifer DB, Lambert-Messerlian G, Hogan JW, Gardiner AC, Blazar AS, Berk CA. Day 3 serum inhibin-B is predictive of assisted reproductive technologies outcome. *Fertil Steril*. 1997 Jan;67(1):110-4.
13. Hendriks DJ, Mol BW, Bancsi LF, te Velde ER, Broekmans FJ. The clomiphene citrate challenge test for the prediction of poor ovarian response and nonpregnancy in patients undergoing in vitro fertilization: a systematic review. *Fertil Steril*. 2006 Oct;86(4):807-18.

14. Navot D, Rosenwaks Z, Margalioth EJ. Prognostic assessment of female fecundity. *Lancet*. 1987 Sep 19;2(8560):645-7.
15. de Carvalho BR, Rosa e Silva AC, Rosa e Silva JC, dos Reis RM, Ferriani RA, Silva de Sa MF. Ovarian reserve evaluation: state of the art. *J Assist Reprod Genet*. 2008 Jul;25(7):311-22.
16. Shrestha SM, Costello MF, Sjoblom P, McNally G, Bennett M, Steigrad SJ, et al. Power Doppler ultrasound assessment of follicular vascularity in the early follicular phase and its relationship with outcome of in vitro fertilization. *J Assist Reprod Genet*. 2006 Apr;23(4):161-9.
17. Kim SH, Ku SY, Jee BC, Suh CS, Moon SY, Lee JY. Clinical significance of transvaginal color Doppler ultrasonography of the ovarian artery as a predictor of ovarian response in controlled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization and embryo transfer. *J Assist Reprod Genet*. 2002 Mar;19(3):103-12.
18. Visser JA, Themmen AP. Anti-Mullerian hormone and folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol*. 2005 Apr 29;234(1-2):81-6.
19. Barbieri RL, MD. H, In Strauss FJ, (eds) BR. *Reproductive endocrinology*. Pennsylvania:Elsevier Inc, 5th ed, pp 839-87327. 2004:839-73.
20. Schlegel PN, SK. G. In vitro fertilization for male factor infertility. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* ; 82(3): 709-716. 1997.
21. Hugues JN, Cédric Durnerin IC. Revisiting gonadotrophin-releasing hormone agonist protocols and management of poor ovarian responses to gonadotrophins. *Hum Reprod Update*. 1998 Jan-Feb;4(1):83-101. Review. PubMed PMID: 9622415.
22. Barbieri RL, Hornstein MD. In Strauss FJ, Barbieri RL (eds), *Reproductive endocrinology*. Pennsylvania:Elsevier Inc., 5th ed, 2004, pp 839-873.
23. Reissmann T, Schally AV, Bouchard P, et al. The LHRH antagonist Cetrorelix: a review. *Human Reproduction Update* 2000; 6(4):322-331.
24. Gondos B, Westergaard L, Byskov AG. Initiation of oogenesis in the human fetal ovary: ultrastructural and squash preparation study. *Am J Obstet Gynecol*. 1986 Jul;155(1):189-95.
25. Ammini AC, Pandey J, Vijayaraghavan M, Sabherwal U. Human female phenotypic development: role of fetal ovaries. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994 Aug;79(2):604-8.
26. Lin YC, Chang SY, Lan KC, Huang HW, Chang CY, Tsai MY, et al. Human oocyte maturity in vivo determines the outcome of blastocyst development in vitro. *J Assist Reprod Genet*. 2003 Dec;20(12):506-12.
27. Balaban B, Urman B. Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation. *Reprod Biomed Online*. 2006 May;12(5):608-15.
28. McKenzie LJ, Pangas SA, Carson SA, Kovanci E, Cisneros P, Buster JE, et al. Human cumulus granulosa cell gene expression: a predictor of fertilization and embryo selection in women undergoing IVF. *Hum Reprod*. 2004 Dec;19(12):2869-74.

29. Assou S, Haouzi D, Mahmoud K, Aouacheria A, Guillemin Y, Pantesco V, et al. A non-invasive test for assessing embryo potential by gene expression profiles of human cumulus cells: a proof of concept study. *Mol Hum Reprod*. 2008 Dec;14(12):711-9.
30. Lee KS, Joo BS, Na YJ, Yoon MS, Choi OH, Kim WW. Cumulus cells apoptosis as an indicator to predict the quality of oocytes and the outcome of IVF-ET. *J Assist Reprod Genet*. 2001 Sep;18(9):490-8.
31. Tanghe S, Van Soom A, Nauwynck H, Coryn M, de Kruif A. Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Mol Reprod Dev*. 2002 Mar;61(3):414-24.
32. Furger C, Cronier L, Poirot C, Pouchelet M. Human granulosa cells in culture exhibit functional cyclic AMP-regulated gap junctions. *Mol Hum Reprod*. 1996 Aug;2(8):541-8.
33. Eisenbach M. Sperm chemotaxis. *Rev Reprod*. 1999 Jan;4(1):56-66.
34. Tatemoto H, Sakurai N, Muto N. Protection of porcine oocytes against apoptotic cell death caused by oxidative stress during In vitro maturation: role of cumulus cells. *Biol Reprod*. 2000 Sep;63(3):805-10.
35. Delorenzo RJ, Sun DA, Deshpande LS. Cellular mechanisms underlying acquired epilepsy: the calcium hypothesis of the induction and maintenance of epilepsy. *Pharmacol Ther*. 2005 Mar;105(3):229-66.
36. Wojda U, Salinska E, Kuznicki J. Calcium ions in neuronal degeneration. *IUBMB Life*. 2008 Sep;60(9):575-90.
37. Bootman MD, Collins TJ, Peppiatt CM, Prothero LS, MacKenzie L, De Smet P, et al. Calcium signalling--an overview. *Semin Cell Dev Biol*. 2001 Feb;12(1):3-10.
38. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull*. 1993 Jul;49(3):481-93.
39. Knight JA. Review: Free radicals, antioxidants, and the immune system. *Ann Clin Lab Sci*. 2000 Apr;30(2):145-58.
40. Vladimirov YA, Proskurnina EV. Free radicals and cell chemiluminescence. *Biochemistry (Mosc)*. 2009 Dec;74(13):1545-66.
41. Halliwell B, Gutteridge JM. Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update. *FEBS Lett*. 1992 Jul 27;307(1):108-12.
42. Memişoğulları R. Diyabette Serbest Radikallerin Rolü ve Antioksidanların Etkisi. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi* 2005; 3:30-9.
43. Kılınç K, Kılınç A. Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2002; 33(2):110-8.
44. Altan N, Dinçel AS, Koca C. Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres *Türk Biyokimya Dergisi* 2006; 31(2):51-6.

45. Karihtala P, Soini Y. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *APMIS*. 2007 Feb;115(2):81-103.
46. Gümüştaş MK, Atukeren P. Oksidatif ve nitrozatif stresin psikiyatrik bozukluklar ile ilişkisi. *İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Sempozyum Dizisi* 2008; 62:329-40.
47. Erdal N, Altunkaynak Y, Altunkaynak E, Öztürk M, Mutluay B, Köksal A, ve ark. Migrenli Hastalarda Oksidatif Stresin Göstergesi Olarak Lipid Peroksidasyonunun İncelenmesi. *Düşünen Adam* 2005; 18(3):129-35.
48. Akkoç H. Miyokardiyal İskemi Reperfüzyon Hasarı. *Dicle Tıp Dergisi*, 2008; 35(3):211-5.
49. Halliwell B. Oxygen radicals: a commonsense look at their nature and medical importance. *Med Biol*. 1984;62(2):71-7.
50. Jefferies H, Coster J, Khalil A, Bot J, McCauley RD, Hall JC. Glutathione. *ANZ J Surg*. 2003 Jul;73(7):517-22.
51. Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol*. 2001 Mar;54(3):176-86.
52. Townsend DM, Tew KD, Tapiero H. The importance of glutathione in human disease. *Biomed Pharmacother*. 2003 May-Jun;57(3-4):145-55.
53. Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem*. 2005 Oct;16(10):577-86.
54. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(1):44-84.
55. Hall AG. Review: The role of glutathione in the regulation of apoptosis. *Eur J Clin Invest*. 1999 Mar;29(3):238-45.
56. Nogueira CW, Zeni G, Rocha JB. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. *Chem Rev*. 2004 Dec;104(12):6255-85.
57. Jones DP, Carlson JL, Mody VC, Cai J, Lynn MJ, Sternberg P. Redox state of glutathione in human plasma. *Free Radic Biol Med*. 2000 Feb 15;28(4):625-35.
58. Agarwal A, Gupta S, Sikka S. The role of free radicals and antioxidants in reproduction. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2006 Jun;18(3):325-32.
59. Bejarano I, Terron MP, Paredes SD, Barriga C, Rodriguez AB, Pariente JA. Hydrogen peroxide increases the phagocytic function of human neutrophils by calcium mobilisation. *Mol Cell Biochem*. 2007 Feb;296(1-2):77-84.
60. Uguz AC, Naziroglu M, Espino J, Bejarano I, Gonzalez D, Rodriguez AB, et al. Selenium modulates oxidative stress-induced cell apoptosis in human myeloid HL-60 cells through regulation of calcium release and caspase-3 and -9 activities. *J Membr Biol*. 2009 Dec;232(1-3):15-23.

61. Grynkiewicz C, Poenie M, RY. T. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*. 1985.
62. Placer ZA, Cushman LL, Johnson BC. Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Anal Biochem*. 1966 Aug;16(2):359-64.
63. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem*. 1968 Oct 24;25(1):192-205.
64. Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun*. 1976 Aug 23;71(4):952-8.
65. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951 Nov;193(1):265-75.
66. Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol*. 2005;3:28.
67. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Sep 1;90(17):7915-22.
68. Naziroglu M. Role of Selenium on Calcium Signaling and Oxidative Stress-induced Molecular Pathways in Epilepsy. *Neurochem Res*. 2009 Jun 10. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 19513830.
69. Curnow EC, Ryan JP, Saunders DM, Hayes ES. In vitro developmental potential of macaque oocytes, derived from unstimulated ovaries, following maturation in the presence of glutathione ethyl ester. *Hum Reprod*. 2010 Oct;25(10):2465-74.
70. Tamura H, Takasaki A, Miwa I, Taniguchi K, Maekawa R, Asada H, et al. Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. *J Pineal Res*. 2008 Apr;44(3):280-7.
71. Yang HW, Hwang KJ, Kwon HC, Kim HS, Choi KW, Oh KS. Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. *Hum Reprod*. 1998 Apr;13(4):998-1002.
72. Paszkowski T, Clarke RN. Antioxidative capacity of preimplantation embryo culture medium declines following the incubation of poor quality embryos. *Hum Reprod*. 1996 Nov;11(11):2493-5.
73. Whanger PD. Selenium and the brain: a review. *Nutr Neurosci*. 2001;4(2):81-97.
74. Acevedo CG, Carrasco G, Burotto M, Rojas S, Bravo I. Ethanol inhibits L-arginine uptake and enhances NO formation in human placenta. *Life Sci*. 2001 May 18;68(26):2893-903.
75. Alberg A. The influence of cigarette smoking on circulating concentrations of antioxidant micronutrients. *Toxicology*. 2002 Nov 15;180(2):121-37.

76. Allaire C. Endometriosis and infertility: a review. *J Reprod Med.* 2006 Mar;51(3):164-8.
77. Ebisch IM, Thomas CM, Peters WH, Braat DD, Steegers-Theunissen RP. The importance of folate, zinc and antioxidants in the pathogenesis and prevention of subfertility. *Hum Reprod Update.* 2007 Mar-Apr;13(2):163-74.
78. Paszkowski T, Traub AI, Robinson SY, McMaster D. Selenium dependent glutathione peroxidase activity in human follicular fluid. *Clin Chim Acta.* 1995 May 15;236(2):173-80.
79. Das S, Chattopadhyay R, Ghosh S, Goswami SK, Chakravarty BN, Chaudhury K. Reactive oxygen species level in follicular fluid--embryo quality marker in IVF? *Hum Reprod.* 2006 Sep;21(9):2403-7.
80. Wiener-Megnazi Z, Vardi L, Lissak A, Shnizer S, Reznick AZ, Ishai D, et al. Oxidative stress indices in follicular fluid as measured by the thermochemiluminescence assay correlate with outcome parameters in in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2004 Oct;82 Suppl 3:1171-6.
81. Manda K, Ueno M, Anzai K. AFMK, a melatonin metabolite, attenuates X-ray-induced oxidative damage to DNA, proteins and lipids in mice. *J Pineal Res.* 2007 Apr;42(4):386-93.
82. Tomas-Zapico C, Coto-Montes A. A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes. *J Pineal Res.* 2005 Sep;39(2):99-104.
83. Naziroglu M. TRPM2 Cation Channels, Oxidative Stress and Neurological Diseases: Where Are We Now? *Neurochem Res.* 2011 Mar;36(3):355-66.
84. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003 Jul;4(7):517-29.
85. Berridge MJ. Inositol trisphosphate and calcium mobilization. *Ciba Found Symp.* 1986;122:39-57.
86. Berridge MJ. Phosphatidylinositol hydrolysis and calcium signaling. *Adv Cyclic Nucleotide Res.* 1981;14:289-99.
87. Galione A, Lee HC, Busa WB. Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in sea urchin egg homogenates: modulation by cyclic ADP-ribose. *Science.* 1991 Sep 6;253(5024):1143-6.
88. Dong JB, Tang TS, Sun FZ. Xenopus and chicken sperm contain a cytosolic soluble protein factor which can trigger calcium oscillations in mouse eggs. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Feb 24;268(3):947-51.
89. Endo M, Tanaka M, Ogawa Y. Calcium induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned skeletal muscle fibres. *Nature.* 1970 Oct 3;228(5266):34-6.
90. Keizer J, Smith GD. Spark-to-wave transition: saltatory transmission of calcium waves in cardiac myocytes. *Biophys Chem.* 1998 May 5;72(1-2):87-100.

91. Solovyova N, Veselovsky N, Toescu EC, Verkhatsky A. Ca(2+) dynamics in the lumen of the endoplasmic reticulum in sensory neurons: direct visualization of Ca(2+)-induced Ca(2+) release triggered by physiological Ca(2+) entry. *EMBO J.* 2002 Feb 15;21(4):622-30.
92. Miyazaki S, Shirakawa H, Nakada K, Honda Y. Essential role of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/Ca²⁺ release channel in Ca²⁺ waves and Ca²⁺ oscillations at fertilization of mammalian eggs. *Dev Biol.* 1993 Jul;158(1):62-78.
93. Miyazaki S, Yuzaki M, Nakada K, Shirakawa H, Nakanishi S, Nakade S, et al. Block of Ca²⁺ wave and Ca²⁺ oscillation by antibody to the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in fertilized hamster eggs. *Science.* 1992 Jul 10;257(5067):251-5.
94. McDougall A, Shearer J, Whitaker M. The initiation and propagation of the fertilization wave in sea urchin eggs. *Biol Cell.* 2000 Jul;92(3-4):205-14.
95. Csordas G, Hajnoczky G. SR/ER-mitochondrial local communication: calcium and ROS. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Nov;1787(11):1352-62.
96. Albriex M, Lee HC, Villaz M. Calcium signaling by cyclic ADP-ribose, NAADP, and inositol trisphosphate are involved in distinct functions in ascidian oocytes. *J Biol Chem.* 1998 Jun 5;273(23):14566-74.
97. Chini EN, De Toledo FG. Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate: a new intracellular second messenger? *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002 Jun;282(6):C1191-8.
98. Galione A, Cui Y, Empson R, Iino S, Wilson H, Terrar D. Cyclic ADP-ribose and the regulation of calcium-induced calcium release in eggs and cardiac myocytes. *Cell Biochem Biophys.* 1998;28(1):19-30.
99. Nusco GA, Lim D, Sabala P, Santella L. Ca(2+) response to cADPr during maturation and fertilization of starfish oocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Jan 25;290(3):1015-21.
100. Wilding M, Russo GL, Galione A, Marino M, Dale B. ADP-ribose gates the fertilization channel in ascidian oocytes. *Am J Physiol.* 1998 Nov;275(5 Pt 1):C1277-83.
101. Galione A. Cyclic ADP-ribose, the ADP-ribosyl cyclase pathway and calcium signalling. *Mol Cell Endocrinol.* 1994 Jan;98(2):125-31.
102. Naziroglu M. New molecular mechanisms on the activation of TRPM2 channels by oxidative stress and ADP-ribose. *Neurochem Res.* 2007 Nov;32(11):1990-2001.
103. Perraud AL, Fleig A, Dunn CA, Bagley LA, Launay P, Schmitz C, et al. ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology. *Nature.* 2001 May 31;411(6837):595-9.
104. Steinhardt RA, Lundin L, Mazia D. Bioelectric responses of the echinoderm egg to fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1971 Oct;68(10):2426-30.

105. Jaffe LA. Fast block to polyspermy in sea urchin eggs is electrically mediated. *Nature*. 1976 May 6;261(5555):68-71.
106. Jaffe LA, Cross NL. Electrical regulation of sperm-egg fusion. *Annu Rev Physiol*. 1986;48:191-200.
107. wilding m, matteo ld, d'andretti s, montanaro n, capobianco c, dale b. an oocyte score for use in assisted reproduction assisted reproduction. 2007.
108. D B, SK S, A. C, Clínica Eugin DdP, Obstetrícia i Ginecologia i Medicina Preventiva, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain. bodridaniel@gmail.com, Abstract. Gonadotropin-releasing hormone agonists versus antagonists for controlled ovarian hyperstimulation in oocyte donors: a systematic review and meta-analysis. *Fertil and steri* 2011 Jan:164-9.